

**Einfluß von Pharmaka auf die
Bestimmung der Harnsäure
nach der Urica-Quant-Methode**

Horst Wittner

1975
5

**Einfluß von Pharmaka auf die
Bestimmung der Harnsäure
nach der Urica-Quant-Methode**

Horst Wittner



Aus der I. Medizinischen Klinik des Rheumazentrums
Bad Abbach

Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Mathies

EINFLUSS VON PHARMAKA AUF DIE BESTIMMUNG DER
HARNSÄURE NACH DER URICA - QUANT - METHODE

Inaugural - Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT
zu MÜNCHEN

VORGELEGT VON

H o r s t W i t t n e r

aus

P a s s a u

1 9 7 5

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Mathies
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Zöllner
Tag der mündlichen Prüfung:	28. 10. 1975

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	<u>Einleitende Bemerkungen</u>	Seite
1.1	Geschichte der Harnsäurebestimmung.	1
1.2	Gängige Methoden der Harnsäurebestimmung.	7
1.2.1	Prinzip der Methoden der Harnsäurebestimmungen und deren Problematik.	8
1.3	Problemstellung der vorliegenden Arbeit.	13
1.4	Grundsätzliche Überlegungen zur Ermittlung des Einflusses von Pharmaka auf die Ergebnisse von Laboruntersuchungen.	13
2.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	
2.1	Erläuterungen der Uricase-UV-Methode	16
2.2	Erläuterungen der Urica-quant-Methode	21
2.3	Material und Methodik	25
2.3.1	Gewinnung der Serumproben	25
2.3.2	Versuchsablauf	25
2.3.3	Reaktionsschema	26
2.4	Statistische Auswertung der Untersuchungser- gebnisse.	27
2.4.1	Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung des Harnsäuregehaltes.	27
2.4.1.1	Ermittlung der Harnsäurewerte für die statisti- sche Auswertung.	28
2.4.1.2	Statistische Analyse der Harnsäurewerte	28
2.4.1.2.1	Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung der Harnsäure an Hand der Prä- zision in der Serie sowie an Hand der Präzision von Tag zu Tag.	28
2.4.1.2.2	Überprüfung der Beeinflussung der Präzision der Methode durch die Harnsäurekonzentration.	30
2.4.1.2.3	Überprüfung der Linearität der Extinktions/ Konzentrationsbeziehung an Hand des Lambert- Beer'schen Gesetzes.	30

2.4.1.3	Diskussion der Ergebnisse	32
2.4.2	Vergleich von Harnsäurebestimmungswerten nach der Urica-quant-Methode und nach der Referenzmethode Uricase-UV in pharmakafreien Seren	33
2.4.2.1	Ermittlung der Basisdaten für die statistische Analyse	33
2.4.2.2	Statistische Analyse der nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode bestimmten Harnsäuregehalte	33
2.4.2.2.1	Überprüfung der Übereinstimmung der Harnsäurewerte nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode	34
2.4.2.2.2	Überprüfung der Abhängigkeit der Differenzen der Harnsäuregehalte aus Bestimmungen nach Uricase-UV und Urica-quant von der Harnsäurekonzentration im Serum	37
2.4.2.2.3	Überprüfung der aus den Bestimmungen nach Uricase-UV und Urica-quant resultierenden methodischen Differenzen hinsichtlich ihrer statistischen Verteilung	39
2.4.2.3	Diskussion der Ergebnisse	42
2.4.3	Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka-Applikation in vitro	44
2.4.3.1	Herstellung der pharmakahaltigen Seren	44
2.4.3.2	Diskussion der Ergebnisse	47
2.4.4	Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka-Applikation in vivo	49
2.4.4.1	Ermittlung der Testwerte	49
2.4.4.2	Diskussion der Ergebnisse	49
3.	Zusammenfassung	52
4.	Literaturnachweis	55

1. E I N L E I T E N D E B E M E R K U N G E N

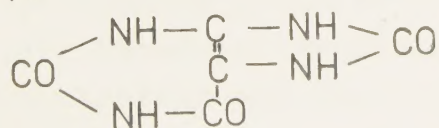
1.1 G e s c h i c h t e d e r H a r n s ä u r e - b e s t i m m u n g

Vor fast genau 200 Jahren entdeckten gleichzeitig SCHEELE und BERGMANN die Harnsäure in Harn und Blasensteinen. Man fand ein farbloses, sandiges Pulver, das in Wasser schwer, in Schwefelsäure dagegen leicht löslich ist und mit Wasser wieder ausgefällt werden kann. Die Salze werden als Urate bezeichnet. Sie finden sich im Harn der Säugetiere nur in geringen Mengen - ein erwachsener Mensch scheidet täglich etwa 1 g aus - während die Exkremente von Vögeln und Reptilien zu etwa 90 % aus Ammoniumsalzen der Harnsäure bestehen.

Im Organismus wird die Harnsäure als Endprodukt des Purinstoffwechsels gebildet. Endogen stammt sie aus dem Stoffwechsel der im Körper enthaltenen Nukleinsäuren und Nukleoproteide, exogen werden dem Organismus mit der Nahrung Purinkörper zugeführt (RETTENBACHER).

Im Jahre 1882 gelang es HORBACZEWSKI die Harnsäure durch Zusammenschmelzen von Glykokoll mit der zehnfachen Menge von Harnstoff auf 200 - 230° C synthetisch darzustellen.

Eine zweite Synthese der Harnsäure, welche HORBACZEWSKI durch Einwirkung von Trichlormilchsäure auf Harnstoff gelang, führte zu der von MEDICUS zuerst angegebenen Konstitutionsformel der Harnsäure, wonach diese als Acrylsäurediureid aufgefaßt werden muß (EULENBURG).



Zum Nachweis und zur Bestimmung der Harnsäure wurden in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts folgende Methoden ausgeführt:

Die gebräuchlichsten Harnsäurenachweise waren

a) Murexidprobe -

Einige Harnsäurekriställchen (welche durch Abscheiden aus 50 mm Harn und 1/4 Reagenzglas konzentrierter Salzsäure im Spitzglas gewonnen wurden) werden auf Porzellanscherben mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure versetzt und über kleiner Flamme erhitzt. Unter Abrauchen der Salpetersäure entsteht ein gelber Rückstand. Dieser färbt sich mit Ammoniak versetzt purpurrot, mit Natronlauge purpurviolett. (Aus EULENBURG)

b) Durch Kochen einer Lösung von Harnsäure in Alkalilauge mit einer alkalischen Kupferlösung (FEHLING'sche Flüssigkeit) scheidet sich weißes, harnsaures Kupferoxydul aus. Ist die Menge des Kupferoxyds im Verhältnis zur Harnsäure im geringen Überschuß und erhitzt man längere Zeit, so scheidet sich rotes Kupferoxydul aus. (Aus EULENBURG)

An Harnsäurebestimmungsmethoden aus diesem Zeitraum seien erwähnt:

a) SALKOWSKI's Methode der Harnsäurebestimmung.

250 ccm Harn werden mit 50 ccm ammoniakalischer Magnesiamischung versetzt, sofort filtriert (um die Bildung von schwerlöslicher, harnsaurer Magnesia zu vermeiden).

Vom Filtrat mißt man 250 ccm = 200 ccm Harn ab und fällt mit einer 3%igen Lösung von Silbernitrat. Der entstehende Niederschlag setzt sich schnell ab, die Flüssigkeit darüber ist klar, von dieser versetzt man eine kleine Probe mit Salpetersäure; entsteht hierauf deutliche Trübung von Chlorsilber, dann war der Silberzusatz genügend, im anderen Falle macht man die Probe mit Ammoniak wieder alkalisch, gießt sie zurück, setzt mehr Silberlösung hinzu und prüft auf's Neue. Der Niederschlag von harnsaurem Silberoxydmagnesia wird sofort auf ein Faltenfilter gebracht und mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat beim Ansäuern mit Salpetersäure keine Trübung mehr gibt und die auf Zusatz von Silberlösung entstehende Trübung nur mehr sehr minimal ist. Hierauf bringt man Filter samt Niederschlag in einen weithalsigen Kolben, fügt 200 ccm Wasser hinzu, schüttelt gut durch, leitet Schwefelwasserstoffgas ein, erhitzt zum beginnenden Sieden, versetzt mit einigen Tropfen Salzsäure bis zur deutlich sauren Reaktion, filtriert vom Schwefelsilber und dem Papierbrei ab und wäscht einige Male mit heißem Wasser nach. Das klare Filtrat dampft man in einer Porzellanschale auf wenige Kubikzentimeter ein, fügt einige Tropfen Salzsäure hinzu und sammelt den nach 24 Stunden in der Kälte ausgeschiedenen Niederschlag auf einem gewogenen Filter, wäscht zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol, schließlich mit absolutem Alkohol und Äther, trocknet und wägt. Das Waschwasser wird für sich gesammelt und gemessen und für je 10 ccm desselben 0,48 mg Harnsäure hinzuaddiert. (Aus EULENBURG)

- b) Das Verfahren von SALKOWSKI wurde durch E. LUDWIG in einer Weise modifiziert, welche eine raschere Ausführung der Bestimmung gestattet. Nach E. LUDWIG wird die Fällung der Harnsäure durch ammoniakalische Silberlösung gleichzeitig mit dem Zusatz von Magnesia-

mixtur ausgeführt, ferner das entstehende Magnesiumsilbersalz der Harnsäure mit Schwefelalkali zerlegt.

Zur **A u s f ü h r u n g** der Bestimmung werden 100 - 200 ccm Harn mit 10, respective 20 ccm Silberlösung und Magnesiamixtur - welche vorher in einem Becherglas gemischt und mit so viel Ammoniak versetzt wurden, als zur Lösung des Chlorsilbers erforderlich war - unter Umrühren versetzt. Nach $1/2$ - 1 Stunde wird der Niederschlag filtriert, mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen und hierauf vom Filter in ein Becherglas gebracht. Nun wird zunächst das Filter mit der mit Wasser verdünnten und kochenden Sulfidlösung übergossen, um die zurückgebliebenen Reste des Niederschlages zu zersetzen, man filtriert in das den Niederschlag enthaltende Becherglas, wäscht mit heißem Wasser nach und erhitzt. Nach dem Erkalten wird vom Schwefelsilber und den Phosphaten abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure schwach angesäuert und auf 10 - 15 ccm eingeengt. Die sich ausscheidende Harnsäure wird auf ein bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, etwaiger beigemengter Schwefel wird durch Schwefelkohlenstoff am Filter gelöst, dieser wird durch Äther verdrängt, hierauf das Filter wieder bei 100° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und gewogen. Aus eiweißhaltigen Harnen muß das Eiweiß vorher durch Erhitzen des Harns mit gesättigter Kochsalzlösung und einigen Tropfen Essigsäure entfernt und hierauf die Harnsäure im eiweißfreien Filtrate bestimmt werden.
(Aus EULENBURG)

Zur Erfassung der Harnsäure in Körperflüssigkeiten haben im Prinzip bis jetzt zwei Arten von Methoden Bedeutung erlangt:

- I. Chemische Farbttests
- II. Enzymatische Bestimmungen

Einen großen Schritt zur modernen Harnsäurebestimmung bedeutete die Beobachtung OFFER's im Jahre 1894, daß die Harnsäure im alkalischen Milieu Phosphormolybdänsäure reduziert und dabei Molybdänblau bildet (OFFER). Diese Farbreaktion, deren Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, kann photometrisch ausgewertet werden.

Quantitativ erfaßt wurde diese Beobachtung von FOLIN und seinen Mitarbeitern DENIS und WU nach vorgängiger Isolierung der Harnsäure als Silbersalz (FOLIN and DENIS). Diese Autoren verwendeten Phosphorwolframsäure, zur Alkalinisierung verwendeten dieselben Autoren Carbonat.

BENEDICT und HITCHCOCK fügten dem Reagenz Zyanid zur Intensivierung und Stabilisierung der Farbe bei und erzielten damit eine größere Empfindlichkeit (BENEDICT and HITCHCOCK). Bei dieser Farbreaktion entsteht durch Reduktion aus der Phosphormolybdänsäure Molybdänblau und aus der Harnsäure durch Oxydation Allantoin und Kohlendioxyd. Durch geeignete Wahl der Reagenzien und vor allem des pH konnten mit dieser Methode schon brauchbare Ergebnisse erzielt werden, insbesondere mit der neuartigen Methode, die CARAWAY entwickelte (CARAWAY).

Nach Vorarbeiten von BLAU und KOCH (1939) führten BULGER und JOHNS im Jahre 1941 die Uricase als analytisches Hilfsmittel ein (BULGER und JOHNS). Dieses Enzym zersetzt unter geeigneten Bedingungen Harnsäure in Allantoin, Kohlendioxyd und Wasserstoffperoxyd. Außer der Harnsäure sind keine physiologischen Verbindungen bekannt, die durch Uricase gespalten werden. Die Methoden, die mit Uricase arbeiten, sind daher außerordentlich spezifisch. Die zuerst beschriebenen Techniken waren kolorimetrischer Natur und bedienten sich der Uricase einzig dazu, in einem Ansatz die Harnsäure zu eliminieren. Die Harnsäure wurde dann aus der Extinktionsdifferenz zwischen dem nicht behandelten und dem mit Uricase behandelten Ansatz berechnet (BLOCK and GELB; WOLFSON; HUDDLESTON and LEVINE).

Diese Methoden waren technisch ziemlich aufwendig und wenig zuverlässig (BIEN and TROLL).

KALCKAR und SCHAFFRAN führten 1947 die UV-photometrisch-enzymatische Methode in die Harnsäurediagnostik ein (KALCKAR). Die beim Abbau der Harnsäure durch Uricase entstehenden Endprodukte - Allantoin, Wasserstoffperoxyd und Kohlendioxyd - besitzen im Gegensatz zur Harnsäure keine Extinktion in diesem Meßbereich. Aus der Abnahme der Extinktion bei 293 nm unter Einwirkung von Uricase kann daher direkt auf die ursprüngliche Harnsäurekonzentration geschlossen werden (RICHTERICH). Diese Methode wurde von verschiedenen Autoren (PRAETORIUS und POULSEN; LIDDLE et al.; ZÖLLNER) wiederholt verbessert.

Die heute verwendeten Techniken lehnen sich alle an die Arbeitsvorschrift von PRAETORIUS und POULSEN an (PRAETORIUS und POULSEN).

PRAETORIUS zeigte auch, daß eine Enteiweißung des Plasma oder Serum bei der Verwendung der enzymatischen UV-photometrischen Methode nicht notwendig ist.

1972 wurde diese Methode von KORTÜM und KLING in einer detaillierten Vorschrift von weiteren Fehlerquellen befreit (MERTZ).

Insbesondere wurde sie dadurch verbessert, daß der sog. "Glycerinfehler" durch Zusatz einer der Uricaselösung entsprechenden Glycerinlösung zur Blindlösung vermieden wurde.

Von KAGAYAMA wurde dieser Test 1972 zu einer direkten kolorimetrischen Bestimmung der Harnsäure mit einem Uricase - Katalasesystem weiterentwickelt. Die Methode liegt dem Testansatz Urica-quant zugrunde. Der Einfluß von Pharmaka auf diese Methode wird in dieser Arbeit geprüft.

1.2 Gängige Methoden der Harnsäurebestimmung

Zur Bestimmung der Harnsäure gibt es mehrere Möglichkeiten. Alle Bestimmungsmethoden sind Oxydationsmethoden, wobei die Oxydation entweder rein chemisch oder enzymatisch erfolgen kann.

Methoden, die auf chemischer Oxydation beruhen:
=====

- Phosphorwolframatmethode nach FOLIN und DENIS
mit den Modifikationen nach
- HEILMEYER und KREBS
- Acc Uric (Testsatz Makro und Mikro der Fa. Goedecke)
- dito Auto-Analyser (Technikon-Apparat)

Methoden, die auf enzymatischer Oxydation beruhen:
=====

(Uricase - Methoden)

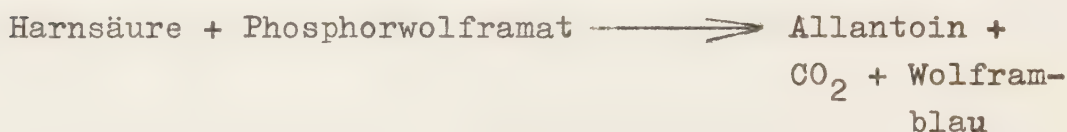
- Polarometrische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs
(z.B. mit dem Beckman-Analyser)
- UV-Messung der Harnsäureabnahme
(Testsatz der Firma Boehringer Mannheim)
- KAGEYAMA (Testsatz Urica-quant der Firma Boehringer Mannheim)

(Nach GRUBER: Methodenvergleich zur Harnsäurebestimmung)

1.2.1 Prinzip der Harnsäurebestimmungsmethoden und deren Problematik

Bei der chemischen Oxydation werden Oxydationsmittel bevorzugt, welche unter Farbänderung reduziert werden, um die Reaktion optisch meßbar zu machen. Es hat sich bei dieser Bestimmungsmethode vor allem Phosphorwolframat nach FOLIN und DENIS in den verschiedensten Modifikationen durchgesetzt (FOLIN und DENIS).

Dabei wird Phosphorwolframat durch Harnsäure zu Wolframblau reduziert. Die Extinktion des blauen Farbstoffes ist der Harnsäurekonzentration proportional und kann im Bereich 560 - 720 nm gemessen werden.



Modifikationen sind:

Die Wolframatmethode nach HEILMEYER und KREBS

Der Testsatz Aoc Uric (Mikro und Makro)
(CAROLL, COBURN, DOUGLAS und BABSON)

Die Wolframat-Methode ist auch automatisierbar (Einkanal). Sie ist für Analysenautomaten, welche durch Dialyse enteiweißen, gut geeignet (z.B. die Techniconapparate). Alle chemischen Farbtests haben mehr oder weniger die gleichen Schwierigkeiten. Vor allem ist hier zu nennen, daß das LAMBERT - BEER'sche Gesetz oft nicht erfüllt ist.

Da die Färbung des Wolframblau unter verschiedenen Bedingungen etwas variiert, müssen jeweils Eichkurven erstellt, bzw. Standards mitgeführt werden (GRUBER). Die der chemischen Methode zugrunde liegende Farbreaktion ist unspezifisch, so geben auch

andere reduzierende Substanzen wie Gluthathion, Ascorbinsäure, Cystein und Coffein mit den zugeführten Reagenzien Farbkomplexe (RETTENBACHER). Die Richtigkeit wird durch diese reduzierenden Substanzen erheblich beeinträchtigt, besonders bei den manuellen Methoden, weniger bei den automatisierten (GRUBER). Deshalb muß vor allem wegen der Serumproteine in jedem Fall enteiweißt werden. Die Enteiweißung muß sehr sorgfältig durchgeführt werden, um nach Möglichkeit ein Mitfällen der Harnsäure durch das ausfallende Eiweiß zu vermeiden (RETTENBACHER).

Die Genauigkeit der chemischen Methoden läßt zu wünschen übrig. Im allgemeinen muß bei den Phosphorwolframsäureverfahren - bei Einzelabweichungen bis zu 68 % besonders bei Acc-uric-mikro - mit 15 - 20 % zu hohen Werten gerechnet werden (MERTZ). Bei Acc-uric-mikro kommt es wegen der kleinen Mengen der Testsubstanz zu einer starken Erhöhung der zufälligen Fehler (BÜNEMANN und KRUSE-JARRES). Bei allen drei reduzierenden Methoden ist eine sorgfältige Reinigung der Küvetten nach jeder Messung notwendig, da Natrium-Karbonatrückstände als Kristallisationskeime dienen. Es werden z.T. erhebliche Extinktionsdifferenzen vor und nach Reinigung der Küvetten gefunden. Die Analysendauer wird unter diesen Bedingungen nicht unerheblich verlängert (BÜNEMANN und KRUSE-JARRES). Bei der Methode nach HEILMEYER und KREBS ist es oft schwierig, ein eiweißfreies, klares Filtrat zu bekommen. Der Arbeitsaufwand, bedingt durch sechs Pipettiervorgänge und das Filtrieren ist höher als bei allen anderen Methoden (BÜNEMANN und KRUSE-JARRES). Ein weiterer Nachteil der auf chemischer Oxydation beruhenden Methoden ist die Störung der Reaktion durch viele Pharmaka, was zu teilweise erheblichen Verfälschungen von Laborresultaten führt. Die Richtigkeit der Phosphorwolframatmethode kann verbessert werden durch Isolierung der Harnsäure aus der Probe, z.B. mit Ionenaustauschern. Diese Methode ist aber ziemlich aufwendig und die erreichbare Präzision weniger gut (GRUBER).

Bei den enzymatischen Methoden der Harnsäurebestimmung wird die Oxydation mit Sauerstoff durch das sehr spezifische Enzym Uricase, das aus verschiedenen Bakterien und aus Säugertierlebern isoliert wurde, katalysiert. Bei der enzymatischen Bestimmung mit Uricase kann im Prinzip jeder Reaktionspartner zur Bestimmung verwendet werden. Die Bestimmung von Allantoin und Sauerstoff ist aber ohne praktische Bedeutung (GRUBER).

Eine enzymatische Harnsäurebestimmungsmethode ist die Messung der Harnsäurekonzentration mit dem Beckman-Analyser. Sie basiert auf der polarometrischen Messung des Sauerstoffverbrauchs während der enzymatischen Oxydation in Gegenwart von Uricase mit Hilfe einer polarographischen Sauerstoff-Elektrode. Als Meßgröße dient die Abnahmegeschwindigkeit der Sauerstoffkonzentration während der Katalyse. Der Sauerstoffverbrauch wird elektronisch umgerechnet und liefert den Meßwert in mg pro 100 ml/Harnsäure bezogen auf den Eichstandard. Diese Methode liefert gute Richtigkeit und Präzision (GRUBER), jedoch ist der apparative Aufwand relativ groß. Die Proben müssen nicht enteiweißt werden, jedoch ist die Erstellung von Eichkurven und die Mitführung eines Standards erforderlich. Außerordentlich wichtig ist exaktes Einhalten der Temperatur, sowohl bei Reagenz als auch bei den Serumproben. Durch den schwer einstellbaren Beckman-Inkubator für das Serum kommt es oft zu Temperaturschwankungen mit beträchtlich veränderten Werten. Bei dieser Methode werden die Vorzüge des sehr geringen Zeitaufwandes für die Analyse, sowie der geringen benötigten Probenmenge durch diese erhebliche Instabilität der Analysenergebnisse wieder aufgehoben (BÜNEMANN und KRUSE-JARRES).

Eine weitere enzymatische Harnsäurebestimmungsmethode ist die UV-Spektrophotometrie mit Uricase.

Prinzip: Harnsäure hat bei 293 nm ein Extinktionsmaximum mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $12,6 \cdot 10^3$. Unter Einwirkung von Uricase spielt sich folgende Reaktion ab:



Da Allantoin, Wasserstoffperoxyd und Kohlendioxyd bei 293 nm nicht absorbieren, kann aus dem Verschwinden der Extinktion direkt auf die vorliegende Harnsäurekonzentration geschlossen werden (eine genaue Beschreibung der Bestimmungsmethode erfolgt in einem späteren Kapitel dieser Arbeit). Diese photometrische Bestimmung weist sicher die beste Richtigkeit auf, da bisher kein weiteres Substrat gefunden wurde, das von Uricase umgesetzt wird.

Die Umsetzung erfolgt quantitativ und irreversibel. Es muß nicht enteiweißt werden. Da der Harnsäuregehalt mittels des bekannten Extinktionskoeffizienten berechnet wird, braucht kein Standard mitgeführt zu werden. Bei exaktem, sauberem Arbeiten läßt sich eine befriedigende Präzision erreichen (GRUBER). Der apparative Aufwand dieser Methode ist jedoch relativ groß. Man braucht ein gutes Spektralphotometer. Der UV-Test stellt also bestimmte apparative Anforderungen, die nicht in jedem Kliniklabor zur Verfügung stehen. Deshalb wurde vielerorts auf semiquantitative unspezifische Methoden ausgewichen, deren Ergebnisse jedoch immer wieder zu Mißverständnissen und ärztlichen Fehlleistungen führten (MERTZ). Angesichts der in den letzten Jahren zunehmenden Gicht Häufigkeit war es nun notwendig, auch kleineren klinischen Labors eine einfach auszuführende, keinen großen apparativen Aufwand benötigende, sichere Harnsäurebestimmungsmethode als zuverlässiges Routineverfahren an die Hand zu geben (GRUBER).

Auf eine einfache direkte kolorimetrische Bestimmung der Harnsäure mit einem Uricase-Katalasesystem machte KAGEYAMA aufmerksam.

Prinzip der Reaktion: Das durch Harnsäurespaltung mittels Uricase entstehende Wasserstoffperoxyd oxydiert mit Hilfe von Katalase Methanol zu Formaldehyd, welche wiederum bei Vorhandensein von Ammoniumionen mit Acetyl-Aceton eine gelbgefärbte Verbindung bildet. Die Extinktion zwischen 400-420 nm ist der Harnsäurekonzentration proportional (KAGEYAMA).

Ein Vorteil dieser Methode beruht darauf, daß der durch Cyklisierung entstandene Farbstoff im sichtbaren Licht bei 405 nm gemessen werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendbarkeit lipämischer, leicht ikterischer und leicht hämolytischer Seren, ohne daß vorherige Enteiweißung notwendig wäre. Enteiweißung ist nur bei starker Hämolyse oder Hyperbilirubinämie über 10 mg pro 100 ml/Serum notwendig. Darüber hinaus bietet diese Farbmethode den Vorteil eines geringeren Arbeitsaufwandes bei großen Testserien trotz längerer Testdauer (MERTZ).

Diese neue Harnsäure-Bestimmungsmethode ist als Urica-quant-Methode im Handel.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung der Urica-quant-Methode selbst und ihre Beeinflußbarkeit durch Medikamente zu überprüfen.

1.3. Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Die Probleme der Harnsäurebestimmung sind im vorhergehenden Kapitel angesprochen. Ein wichtiger Problemkreis ist der Einfluß von Pharmaka auf die Harnsäurebestimmungsmethoden. Im Hauptteil dieser Arbeit wird überprüft, ob Pharmaka einen Einfluß auf die mit Hilfe der Urica-quant-Methode bestimmten Harnsäurewerte haben.

1.4. Grundsätzliche Überlegungen zur Ermittlung des Einflusses von Pharmaka auf die Ergebnisse von Laboruntersuchungen

Arzneimittel müssen heute als der größte, noch weitgehend unerforschte und wegen des steigenden Pharmakaverbrauchs ständig zunehmende Störfaktor in der Labormedizin angesehen werden. Sie greifen in physiologische und biochemische Prozesse ein und erhöhen oder senken die (nie ganz exakt festzulegenden) Normalwerte.

Dabei kann diese Veränderung sowohl durch das Arzneimittel selbst, durch ein Abbauprodukt oder durch einen in den Präparaten enthaltenen galenischen Zusatzstoff verändert werden (YOUNG; THOMAL; FRIEDMANN; PRESTNER).

Einwirkungen von Pharmaka auf Laborwerte können allgemein in zwei Kategorien zusammengefaßt werden:

a) Physiologische oder pharmakologische Einwirkungen -

in diesem Fall verändern Pharmaka den tatsächlichen Spiegel der zu messenden Substanz und führen damit zu veränderten Laborwerten.

b) Physikalische oder chemische Interferenzen -

in diesem Fall beeinflussen Pharmaka oder ihre Metaboliten die Laborbestimmungsmethode selbst, führen also in vitro zu Verfälschungen von Laborresultaten.

Oft ist es zweifelhaft, in welche dieser Gruppen eine bestimmte Beeinflussung einzuordnen ist, da bis heute sehr wenige systematische Untersuchungen über solche Störeffekte vorliegen (HANSEN und OWYANG).

In dieser Arbeit sollen lediglich die technischen Interferenzen, also die Verfälschungen von Laborbestimmungsmethoden durch Pharmaka näher erläutert werden.

Mit der wachsenden Anzahl und Komplexizität von Pharmaka und Labortests tritt die Interferenz der Pharmaka in diesen Tests immer häufiger in Erscheinung (HANSEN und OWYANG).

Solche physikalischen und chemischen Interferenzen sind:

- Die meisten in der Röntgenologie verwendeten Kontrastmittel stören Laborbestimmungen auf Grund ihres Jodgehaltes. Ebenso alle jodhaltigen Kosmetika und andere jodhaltige Medikamente.
- Phenazopyridin und Dithiazin verleihen dem Urin ihre eigenen charakteristischen Farben und verursachen eine physikalische Interferenz, die viele kolorimetrischen oder photometrischen Bestimmungen verfälschen.
- Reduzierende Stoffe, die im Urin ausgeschieden werden, können chemische Reaktionen mit Reagenzien eingehen und so einen bestimmten Testvorgang verfälschen.
- Ascorbinsäure, Streptomycin und Penicillin sind nur einige wenige Pharmaka, die mit Kupfersulfat reagieren und damit ungültige, falsch positive Ergebnisse beim BENEDICT-Test liefern.

- Zwischen- oder Endprodukte im Drogenmetabolismus können ebenfalls Laborwerte verfälschen.
- Penicillin und Tolbutamid-Metaboliten geben ein falsch positives Resultat bei der Urin-Proteinbestimmung.
- Psychopharmaka können Urinanalysen verfälschen.

Viele ähnliche Beispiele könnten noch angeführt werden (ELKING and KABAT).

Je mehr diese therapeutischen Wirkstoffe Verwendung finden, besonders auch in Kombination mit anderen Medikamenten, um so schwieriger wird es, Laborresultate richtig auszuwerten, um eine für den Patienten optimale Therapie zu finden. Um die Übersicht über arzneimittelbedingte Interferenzen zu erleichtern und die Interpretation von Labordaten zu verbessern, sollten, wie WEPLER und ROMMEL anstreben, alle Labors einheitlich bestimmte Methoden verwenden. Außerdem ist eine bessere Kooperation von Pharmakologen, klinischen Chemikern und Ärzten anzustreben.

Die auf technischen Interferenzen beruhenden Verfälschungen von Labordaten ließen sich durch die Verwendung von spezifischen analytischen Methoden weitgehend vermeiden.

Es war das Ziel der Erprobung der neuen Harnsäurebestimmungsmethode Urica-quant, eine möglichst hohen Anforderungen genügende, durch Arzneimittel möglichst wenig verfälschte Harnsäurebestimmungsmethode zu finden. Dazu sollte diese Arbeit beitragen.

2. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

Die eigenen Untersuchungen umfassen zunächst die Erläuterung der Uricase-UV- sowie der Urica-quant-Methode. Daran anschließend werden die Gewinnung der Serumproben, der Versuchsablauf und das Reaktionsschema der Urica-quant-Methode umrissen. Der Hauptteil dieses Kapitels umfaßt die statistische Auswertung der eigenen Untersuchungsergebnisse.

2.1 Erläuterung der Uricase-UV-Methode an Hand der Biochemica-Test-Combination der Fa. Boehringer/Mannheim

Harnsäure

UV-Test bei 293 nm oder Hg 297 nm

Best. Nr.: 15986, für ca. 30 Bestimmungen enthält:

- 1 Puffer
- 2 Uricase
- 3 Glycerin

P r i n z i p :

Harnsäure wird durch Uricase in Allantoin und Wasserstoffperoxyd gespalten. Da Harnsäure bei 293 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum besitzt, Allantoin und Wasserstoffperoxyd in diesem Wellenlängenbereich jedoch nicht absorbieren, kann die Abnahme der Harnsäurekonzentration leicht gemessen werden.

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von E. PRAETORIUS und H. POULSEN/10 und M. KORTÜM und O! KLING/11 an.

H e r s t e l l u n g d e r L ö s u n g e n :

- 1 Puffer (100 mM Borat-Puffer, pH = 9,5):

Inhalt der Flasche mit 400 ml bidest. Wasser lösen. Flasche stets verschlossen halten. Bei Raumtemperatur 1 Jahr haltbar.

- 2 Uricase (2,0 mg Uricase/ml 50-proz. Glycerin):

Lösung in Flasche 2 unverdünnt verwenden. Bei ca. + 4° C ein Jahr haltbar.

- 3 50-proz. Glycerin:

Lösung in Flasche 3 unverdünnt verwenden. Bei ca. + 4° C ein Jahr haltbar.

V e r d ü n n u n g d e r P r o b e :

Serum und Harn vor Verdünnung 10 min zentrifugieren.

Auf den Boden von Reagenzgläsern in dieser Reihenfolge pipettieren:

Serum	0,2 ml
oder Harn	0,02 ml
Lösung 1	10,00 ml

mischen, 15 min bei 20-25° C stehen lassen, danach nochmals mischen und die verdünnten Proben zur Bestimmung einsetzen.

B e s t i m m u n g s a n s a t z :

Wellenlänge: 293 nm oder Hg 297 nm

Quarzküvetten: 1 cm Schichtdicke

Temperatur: 20 - 25° C

Messung gegen Leerwert.

Auf den Boden von Reagenzgläsern in dieser Reihenfolge pipettieren:

	Leerwert der Probe	Probe
Lösung 2	-	0,02 ml
Lösung 3	0,02 ml	-
verdünnte Probe	3,5 ml	3,5 ml

mischen, ca. 10 min bei 20-25° C stehen lassen und nochmals mischen. Zwei Küvetten mit A und B beschriften. Zur Bestimmung Probe in Küvette A und Leerwert der Probe in Küvette B gießen. Extinktion der Küvette A auf Null stellen und Extinktion der Küvette B messen. Man erhält die durch den Harnsäureabbau bedingte Extinktionsänderung E_{Probe} .

Für jede Meßreihe muß einmal der Reagenzienleerwert (E_{RL}) ermittelt werden.

Auf den Boden von Küvette A und B in dieser Reihenfolge pipettieren:

	Küvette B	Küvette A
Lösung 2	-	0,02 ml
Lösung 3	0,02 ml	-
Lösung 1	3,5 ml	3,5 ml

mischen, Extinktion von Küvette B auf Null stellen und Extinktion von Küvette A messen (E_{RL}). $E_{\text{Probe}} + E_{\text{RL}} = E_{\text{Harnsäure}}$

Berechnung der Harnsäure - Konzentration

Für die Berechnung von Substrat-Konzentrationen gilt allgemein die Formel

$$c = \frac{MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot \Delta E [\text{mg}/100 \text{ ml}]$$

$$c = \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot \Delta E [\text{mMol/L}]$$

Das Molekulargewicht (MG) der Harnsäure beträgt 168,1 g/mol. Der Extinktionskoeffizient (ϵ) der Harnsäure beträgt bei 293 nm 12,6 cm²/uMol und bei 297 nm 11,66 cm²/uMol. Die Schichtdicke der Küvette ist 1 cm (d).

v ist das Volumen des eingesetzten verdünnten Serums bzw. Harns (3,5 ml), V die Summe der im Pipettierschema angegebenen Volumina (3,52). F ist der Verdünnungsfaktor für Serum (51) bzw. Harn (501).

Daraus folgt die Konzentration (c) der H a r n s ä u r e im S e r u m

$$\text{bei 293 nm: } c = 68,4 \cdot E_{\text{HS}} \quad \text{mg}/100 \text{ ml}$$

$$\text{bei 297 nm: } c = 73,9 \cdot E_{\text{HS}} \quad \text{mg}/100 \text{ ml}$$

im H a r n

$$\text{bei 293 nm: } c = 672 \cdot E_{\text{HS}} \quad \text{mg}/100 \text{ ml}$$

$$\text{bei 297 nm: } c = 726 \cdot E_{\text{HS}} \quad \text{mg}/100 \text{ ml}$$

B e i s p i e l :

0,2 ml Normal-Serum wurden zum Test eingesetzt und folgende Extinktionen bei 293 nm gemessen:

$$E_{\text{Probe}} = 0,071$$

$$E_{\text{RL}} = 0,005$$

$$E_{\text{HS}} = 0,076$$

$$0,076 \cdot 68,4 = 5,2 \text{ mg Harnsäure}/100 \text{ ml Serum.}$$

H i n w e i s e :

Die Proben müssen immer in Küvette A und die Leerwerte der Proben in Küvette B gemessen werden.

Nur trockene Küvetten verwenden oder bei Serienbestimmungen mit 0,5 - 1 ml der zu messenden Lösung spülen.

Bei der Messung des Reagenzienleerwertes werden auch Unterschiede in der Durchlässigkeit der Küvetten eliminiert. Ist dieser Unterschied größer als der Reagenzienleerwert, so kann die Extinktion der Küvette A kleiner als Null sein. In diesem Fall Küvette B auf Extinktion $E = 0,100$ stellen und Extinktion von Küvette A messen. Die gemessene Extinktionsdifferenz ist dann von E_{Probe} abzuziehen ($E_{\text{Harnsäure}}$).

Fingerabdrücke auf den optischen Flächen der Küvette sind zu vermeiden. (Jede Verunreinigung während einer Meßserie führt zu falschen Ergebnissen!)

Eine Verwechslung der Gummistopfen von Flasche 2 und 3 ist unbedingt zu vermeiden. Es empfiehlt sich, die Stopfen entsprechend zu markieren.

A b k ü r z u n g e n :

M	molar
nm	Nanometer

2.2 Erläuterung der Urica-quant-Methode an Hand der Biochemica-Test-Combination der Fa. Boehringer/Mannheim

Urica - quant Harnsäure Enzymatischer Farbstest

Best. Nr.: 15865 für ca. 50 Bestimmungen
 Best. Nr.: 15866 für ca. 180 Bestimmungen
 enthält:

- 1 Puffer/Katalase
- 2 Chromogen
- 3 Standard
- 4 Uricase

P r i n z i p :

Harnsäure wird durch Uricase in Allantoin und Wasserstoffperoxyd gespalten. Das entstandene Wasserstoffperoxyd oxydiert mit Hilfe des Enzyms Katalase Methanol zu Formaldehyd. In Gegenwart von Ammoniumionen bildet Formaldehyd mit Acetylaceton eine gelbgefärbte Verbindung, deren Farbintensität der Harnsäure-Konzentration proportional ist und zwischen 405 und 415 nm gemessen wird.

Die im folgenden beschriebene Methode lehnt sich an die Angaben von N. KAGEYAMA an.

H e r s t e l l u n g d e r L ö s u n g e n :

- 1 Puffer/Katalase (0,5 M Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7; 2,5 M Methanol; 700 U Katalase/ml):

Bei der Packung für 50 Tests Inhalt einer Flasche 1 bei Bedarf mit 50 ml bidest. Wasser v e r d ü n n e n.
 Bei der Packung für 180 Tests Lösungen in den Flaschen 1 u n v e r d ü n n t verwenden. Flaschen stets verschlossen halten. Bei ca. + 4° C neun Monate haltbar.

2 Chromogen (0,42 M Acetylaceton; 2,5 M Methanol):

Lösung in der Flasche 2 unverdünnt anwenden. Flasche stets verschlossen halten. Bei ca. + 4°C ein Jahr haltbar.

3 Standard-Lösung (6 mg Harnsäure/100 ml bzw. 0,36 ml Mol/L):

Lösung in Flasche 3 unverdünnt verwenden. Flasche stets verschlossen halten. Bei ca. + 4°C ein Jahr haltbar.

4 Uricase-Lösung (5 U Uricase/ml. 50-proz. Glycerin):

Lösung in Flasche 4 unverdünnt verwenden. Flasche stets verschlossen halten. Bei ca. + 4°C ein Jahr haltbar.

5 Harnsäure-Reagenz (0,48 M Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7; 2,5 M Methanol; 20 mM Acetylaceton; 670 U Katalase/ml):

Entsprechend nachstehender Tabelle oder 10 Teile Lösung 1 mit 0,5 Teilen Lösung 2 mischen, in brauner Flasche aufbewahren. Bei ca. + 4°C einen Monat, bei 25°C eine Woche haltbar.

Mischungstabelle für Harnsäure-Reagenz

Anzahl der Proben	ml Lösung 1	ml Lösung 2	Anzahl d. Proben	ml Lösung 1	ml Lösung 2
ca. 5	30	1,5	70	350	17,5
10	50	2,5	80	400	20,0
20	100	5,0	100	500	25,0
30	150	7,5	120	600	30,0
40	200	10,0	140	700	35,0
50	250	12,5	160	800	40,0
60	300	15,0	180	900	45,0

Bestimmungssatz:

Wellenlänge: 405 - 415 nm, z.B. Hg 405 nm;

Spektralphotometer: 410 nm;

Glasküvette: 1 cm Schichtdicke

Inkubationstemperatur: 37° C

Bei Serienbestimmungen (Verwendung von Durchfluß- bzw. Absaugküvetten) empfiehlt es sich, zuerst alle Probenleerwerte und danach alle Proben zu messen.

Serum oder frischen Harn verwenden. Serum unverdünnt einsetzen. Harn 1 + 9 mit bidest. Wasser verdünnen.

Die gerätetechnischen Voraussetzungen für die Verwendung des Faktors müssen mit dem beigegebenem Standard (Flasche 3) überprüft werden. Der Standard ist wie Serum zu behandeln. Aus 5 Standardbestimmungen ist der Mittelwert der Standardextinktionen zu berechnen. Liegt dieser im Bereich von $E_{\text{Hg 405 nm}} = 0,240 \pm 0,012$ bzw. $E_{410 \text{ nm}} = 0,244 \pm 0,012$, so kann die Berechnung über die angegebenen Faktoren erfolgen. Liegt der Mittelwert außerhalb dieser Bereiche, so wird er für alle weiteren Bestimmungen als E_{Standard} in die Berechnung "Probe gegen Standard" eingesetzt.

Auf den Boden von Reagenzgläsern pipettieren:		
	Probenleerwert	Probe
Serum bzw. verdünnter Harn	0,50 ml	-
Lösung 5 (Harnsäure-Reagenz)	5,00 ml	-
Inhalt der Reagenzgläser gut mischen		
Lösung 4	-	0,02 ml
aus dem Reagenzglas des Probenleerwertes abpipettieren*	-	2,50 ml
gut mischen. Probenleerwert und Probe mindestens 60 min bei 37°C inkubieren. Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert (E_{Probe}) messen.		

* In Pipette verbleibenden Rest in Reagenzglas zurückgeben.

Die Berechnung der Konzentration (c) der Harnsäure:

1. Berechnung mit Faktor bei Hg 405 nm

$$\text{Serum: } c = 25 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 1,49 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mMol/l}$$

$$\text{Harn: } c = 250 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 14,9 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mMol/l}$$

bei 410 nm:

$$\text{Serum: } c = 24,6 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 1,46 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mMol/l}$$

$$\text{Harn: } c = 246 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 14,6 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ mMol/l}$$

2. Berechnung Probe gegen Standard:

$$\text{Serum: } c = 6 \cdot \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 0,36 \cdot \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ mMol/l}$$

$$\text{Harn: } c = 60 \cdot \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ mg/100 ml} \quad \text{bzw.}$$

$$c = 3,6 \cdot \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ mMol/l}$$

Bei der Berechnung der Harnsäure-Konzentration im Harn ist der durch die Vorverdünnung bedingte Verdünnungsfaktor 10 bereits berücksichtigt.

H i n w e i s e :

Ein Überschreiten der Inkubationszeit bis zu einer Stunde hat keinen Einfluß auf die Ergebnisse. Eventuell auftretende Trübungen in Lösung 1 können abfiltriert werden. Die Bestimmung wird dadurch nicht beeinflusst. Für die Qualitätskontrolle empfiehlt sich Precilip^R.

A b k ü r z u n g e n : M = molar
 mM = millimolar
 nm = Nanometer

2.3. M a t e r i a l u n d M e t h o d i k

2.3.1 Gewinnung der Serumproben

43 Medikamente aus verschiedenen Indikationsgebieten wurden einem in Einzelportionen aufgeteilten Pharmakafreien Serum-Pool zugesetzt. Die Pharmakakonzentration wurde so gewählt, daß sie einer üblichen Tages-einzelmaximaldosis in der für die orale Applikation vorgesehenen Zubereitung, gelöst in 5 Liter Serum, entsprach. Schlecht lösliche Zubereitungen wurden mindestens 16 Stunden geschüttelt. Nach Abzentrifugation kam der Überstand als gesättigte Serum-Lösung zum Einsatz.

Die in vivo-Untersuchungen wurden an 311 Patienten des Rheumazentrums Bad Abbach durchgeführt. Der Versuch fand in der zweiten Woche nach Hospitalisierung im Rahmen eines mehrwöchigen Kuraufenthaltes statt. Ab Abend vor dem Versuchstag erhielten die Patienten nach 18 Uhr keinerlei Medikamente mehr.

2.3.2 Versuchsablauf

Zeitpunkt
=====

- | | |
|---|--|
| A | 1. Blutabnahme: Leerwert (nüchtern 7.00 Uhr)
Einnahme des Medikamentes,
weiterhin nüchtern. |
| B | 2. Blutabnahme: 1 Stunde nach A
Frühstück und Mittagessen,
keine Medikamente |
| C | 3. Blutabnahme: 8 Stunden nach A |

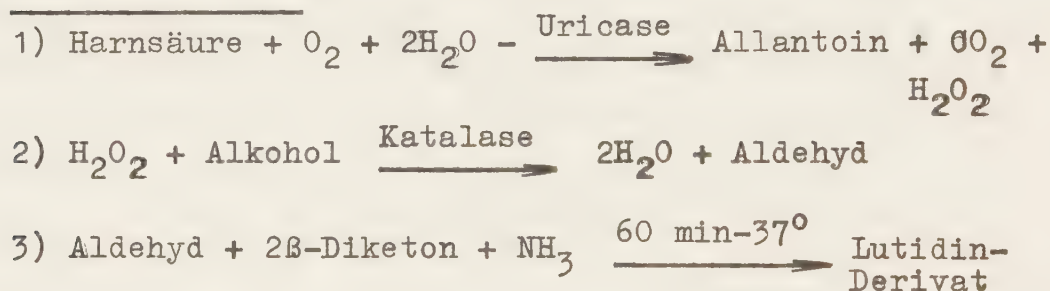
Die Seren wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Hierbei tritt keine Abnahme des Harnsäuregehaltes ein.

Harnsäure-Analytik

Die Harnsäure wurde mit Hilfe der Urica-quant-Methode bestimmt. Als Referenzmethode diente die Uricase-UV-Methode in der Modifikation von KORTÜM und KINK 1972). Testansatz und Auswertung nach Vorschrift der Firma Boehringer, Mannheim (Uricase-UV-Test, Boehringer, Mannheim). Diese Methode wurde ausführlich in Kapitel 2.2 dieser Arbeit beschrieben.

Bevor die Eignung der Urica-quant-Methode und ihre Beeinflußbarkeit durch Pharmaka in den folgenden Abschnitten geprüft wird, sei das Prinzip dieser Harnsäure-Bestimmungsmethode nochmals zusammenfassend erläutert.

2.3.3 Reaktionsschema



Das bei der katalysierten Oxydation von Uricase mit Harnsäure entstehende Wasserstoffperoxyd wird unter Einwirkung von Katalase quantitativ dazu verwendet, Methylalkohol in Formaldehyd umzuwandeln. Der entstandene Formaldehyd wird durch die bekannte Reaktion mit Acetyl-Aceton und Ammoniak (Hantz'sche Reaktion) in ein Lutidin-Derivat umgewandelt, welches der Konzentration der Harnsäure quantitativ entspricht und bei z.B. 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

2.4. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse umfaßt vier Hauptthemen:

- Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung des Harnsäuregehaltes an Hand einer statistischen Auswertung von Harnsäure-Bestimmungswerten nach dieser Methode -
- Vergleich von Harnsäure-Bestimmungswerten nach der Urica-quant-Methode mit solchen nach der Referenzmethode Uricase-UV-
- Überprüfung der Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka - Applikation in vitro -
- Überprüfung der Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka - Applikation in vivo -

2.4.1 Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung des Harnsäuregehaltes

Die Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung des Harnsäuregehaltes wurde an Hand verschiedener statistischer Analysen überprüft. Im einzelnen wurden folgende statistische Überprüfungen vorgenommen:

- Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode an Hand der Präzision in der Serie sowie an Hand der Präzision von Tag zu Tag -
- Überprüfung der Beeinflussung der Präzision der Methode durch die Harnsäure-Konzentration -
- Überprüfung der Linearität der Extinktions/Konzentrationsbeziehung an Hand des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

Die statistisch analysierten Harnsäurewerten wurden auf die nachfolgend beschriebene Art und Weise ermittelt.

2.4.1.1 Ermittlung der Harnsäurewerte für die statistische Auswertung

Für die Präzision in der Serie wurde von der gleichen Arbeitskraft an einem Human-Frischserum im Blindversuch in wiederholten Bestimmungen der Harnsäuregehalt ermittelt. Für die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde ein Humanserum in Einzelportionen aufgeteilt bei -20°C tiefgefroren gelagert. Es handelt sich jeweils um das Ergebnis von Einzelbestimmungen.

Für die Überprüfung der Beeinflussung der Präzision der Methode durch die Harnsäurekonzentration wurden 15-fach Bestimmungen an Frischseren verschiedener Konzentrationsstufen ausgeführt.

Für die Überprüfung der Linearität der Extinktions/Konzentrationsbeziehung an Hand des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurden stufenweise Verdünnungen eines Serums mit hohem Harnsäuregehalt mit einem Serum niedrigen Harnsäuregehaltes vorgenommen und anschließend diese Seren unterschiedlicher Konzentration getestet.

2.4.1.2 Statistische Analyse der Harnsäurewerte

Die einzelnen Arten der durchgeführten statistischen Detailanalysen sind weiter oben bereits genannt.

2.4.1.2.1 Überprüfung der Eignung der Urica-quant-Methode zur Bestimmung der Harnsäure an Hand der Präzision in der Serie sowie an Hand der Präzision von Tag zu Tag

Ein Maß für die Präzision ist die Streuung der einzelnen Meßwerte um den Mittelwert. Sieht man von groben Fehlern ab, ist somit die Präzision ein Ausdruck für die zufälligen Fehler. Je geringer die Streuung,

desto höher ist die Präzision und umso geringer sind die zufälligen Fehler. Üblicherweise ist die Präzision in der Serie (Abweichung der Resultate von Doppel- oder Mehrfachbestimmungen) stets geringer als die Präzision von Tag zu Tag (Abweichung der Resultate von Bestimmungen an aufeinanderfolgenden Tagen). Der Grad der Streuung der einzelnen Meßwerte um den Mittelwert (= arithmetisches Mittel $\bar{x}$) wird mit Hilfe des Variationskoeffizienten in % ausgedrückt.

Das arithmetische Mittel ist bei Normalverteilung repräsentativ für den Schwerpunkt der Verteilung. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$
 , d.h., die Einzelwerte des Harnsäuregehaltes werden summiert und durch die Zahlen der Bestimmungen dividiert. Der Variationskoeffizient drückt die Standard-Abweichung in Prozent des Mittelwertes aus. Er berechnet sich folgendermaßen:

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$
 Die in der Formel auftretende Standardabweichung s entspricht beim Vorliegen einer Normalverteilung einer mathematisch genau definierten Größe. Sie dient zur Beurteilung der Streuung von Einzelwerten um das arithmetische Mittel. Zur Berechnung der Standardabweichung s stehen mehrere Formeln zur Verfügung. Begrifflich ist die folgende am einfachsten:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

Die Standard-Abweichung entspricht somit der Quadratwurzel aus der Summe der Quadrate der Abweichungen der Einzelwerte vom arithmetischen Mittel, dividiert durch die Zahl n der Einzelwerte minus 1. Man wird also zunächst die Differenzen zwischen den Einzelwerten (x) und dem arithmetischen Mittel ($\bar{x}$) bilden und diese Differenzen quadrieren. Diese Quadrate werden addiert und durch die Zahl der Resultate minus 1 dividiert. Mit Hilfe einer Quadratzahlentabelle wird schließlich die Wurzel gezogen.

Für die Präzision in der Serie sowie für die Präzision von Tag zu Tag wurden bei jeweils 40 Analysen folgende arithmetische Mittel und Variationskoeffizienten ermittelt:

Art der Präzision	Anzahl der Analysen	Arithmetisches Mittel ($\bar{x}$) an Harnsäuregehalt in mg/100 ml	Variationskoeffizient VK in %
Präzision in der Serie	40	4,69	1,7
Präzision von Tag zu Tag	40	5,0	4,8

2.4.1.2.2 Überprüfung der Beeinflussung der Präzision der Methode durch die Harnsäurekonzentration

Für ein Serum mit einem Harnsäuregehalt von 3,1 mg/100 ml wurde ein Variationskoeffizient von 3,1 %, für ein Serum mit 7,2 mg Harnsäure/100 ml ein VK von 1,8 % und für ein Serum mit einem Harnsäuregehalt von 16,2 mg/100 ml ein VK von 2,1 % bestimmt.

2.4.1.2.3 Überprüfung der Linearität der Extinktions/Konzentrationsbeziehung anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wird die Beziehung zwischen der Konzentration und Schichtdicke einer Lösung einerseits und der Extinktion andererseits definiert. Bei verschiedenen Harnsäurekonzentrationen wurden Dreifach-Bestimmungen der Extinktion ausgeführt und daraus Mittelwerte errechnet und diese in einem Histogramm (Abb.1) dargestellt.

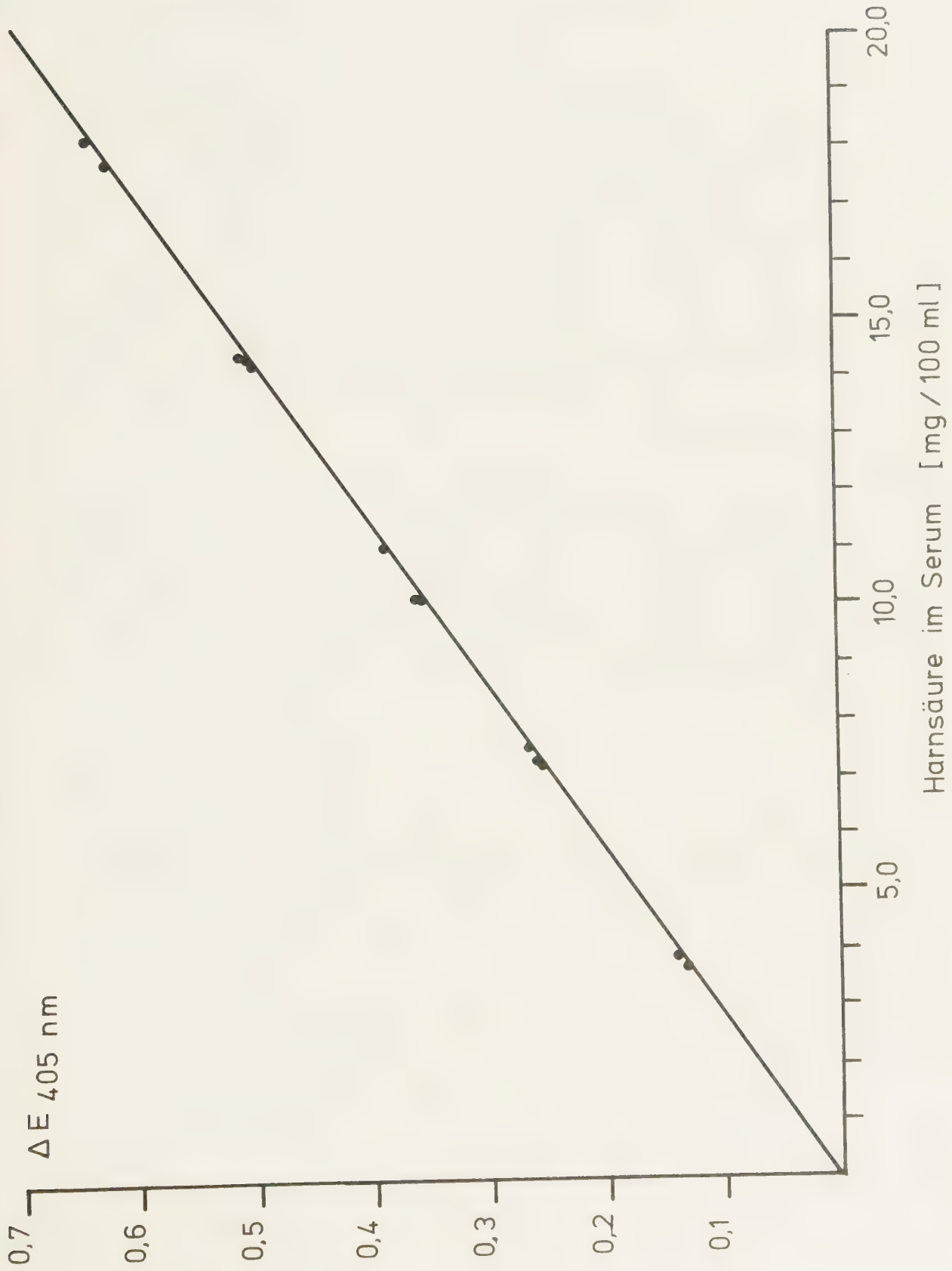


Abb. 1

Überprüfung der Linearität der Extinktions-/Konzentrationsbeziehung

2.4.1.3 Diskussion der Ergebnisse

Es ist schwierig, Angaben über die anzustrebende Präzision einer Methode zu machen; je nach Autor finden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Aussagen. Einig sind sich die meisten Klinischen Chemiker nur darin, daß die bis heute erzielten Resultate unbefriedigend sind und daß zu hoffen ist, daß es, vielleicht durch die Automation gelingen wird, die bisher relativ große Streuung der Resultate zu vermindern. Als Faustregel kann heute gelten, daß der Variations-Koeffizient bei Enzym-Analysen zwischen 5 und 10 % und bei Metabolit-Bestimmungen zwischen 3 und 5 % liegen sollte.

Die an jeweils 40 Analysen ermittelten Variationskoeffizienten von 1,7 % und 4,8 % für die Präzision in der Serie und die Präzision von Tag zu Tag zeigten, daß die erzielten Ergebnisse nach der Uricaquant-Methode durchaus den oben aufgestellten Forderungen genügen.

Die ermittelten Variationskoeffizienten von 3,1 %, 1,8 % und 2,1 % für Harnsäurebestimmungen an Seren mit Harnsäurekonzentrationen von 3,1 mg/100 ml, 7,2 mg/100 ml und 16,2 mg/100 ml sprechen dafür, daß die Präzision der Uricaquant-Methode durch die Harnsäurekonzentration kaum beeinflußt wird.

Die Überprüfung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ergab laut Abb. 1, daß die Reaktion der Uricaquant-Methode bis mindestens 20 mg/Harnsäure/100 ml Serum linear ist.

Weitere Versuche ergaben außerdem, daß ohne Änderung der Linearität der Reaktion auch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden kann.

2.4.2 Vergleich von Harnsäurebestimmungswerten nach der Urica-quant-Methode und nach der Referenz- methode Uricase-UV in pharmakafreien Seren

Bei den nachfolgenden Betrachtungen wurde davon ausgegangen, daß die zur Referenz gewählte Uricase-UV-Methode bereits ausreichend erprobt ist und mit dieser Methode zuverlässige und damit "richtige" Harnsäurewerte bestimmt werden.

2.4.2.1 Ermittlung der Basisdaten für die statistische Analyse

Die für die nachfolgenden statistischen Analysen erforderlichen Basisdaten wurden durch Harnsäurebestimmungen an pharmakafreien Seren und mit Hilfe der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode gewonnen. Hierzu wurden Paar-Analysen an insgesamt 292 Seren unterschiedlicher Konzentration ausgeführt. Eine besondere Bedeutung kommt bei den statistischen Auswertungen den aus den beiden Untersuchungsmethoden resultierenden Differenzen zu.

2.4.2.2 Statistische Analyse der nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode bestimmten Harnsäure- gehalte

Bei der statistischen Analyse der nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode in pharmakafreien Seren bestimmten Harnsäuregehalte wurde folgenden Fragestellungen gezielt nachgegangen:

- Inwieweit stimmen die nach der Urica-quant-Methode bestimmten Harnsäuregehalte mit denjenigen nach der Referenzmethode Uricase-UV ermittelten überein? -

- Wie sind die 292 methodischen Differenzen, die sich aus den Bestimmungen nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode ergeben, statistisch verteilt? -

2.4.2.2.1 Überprüfung der Übereinstimmung der Harnsäurewerte nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode

Die Übereinstimmung der Analysenergebnisse in pharmakafreien Seren nach der Urica-quant-Methode und der Uricase-UV-Methode als Referenzmethode wurde an Hand einer linearen Regressionsanalyse überprüft. Mit Hilfe dieser statistischen Analyse kann der Zusammenhang zwischen zwei abhängigen Variablen, im vorliegenden Fall Bestimmungswerte nach Urica-quant- und Uricase-UV-Methode, nicht nur qualitativ erkannt, sondern auch quantifiziert werden.

Hierzu wurden in Abb. 2 auf der x-Achse (Abszisse), die mit Hilfe der Uricase-UV-Methode gefundenen Harnsäuregehalte, auf der y-Achse (Ordinate) die am gleichen Serum nach Urica-quant ermittelten Harnsäuregehalte aufgetragen. Die sich ergebende, langgestreckte Punktwolke kann bereits nach Augenmaß durch eine Ausgleichsgerade oder Regressionsgerade approximiert werden. Die Regressionsgerade kann auch mathematisch formuliert werden, wobei jene Gerade als Regressionsgerade bestimmt wird, bei der die Summe der Quadrate der Abstände (zwischen Gerade und Meßpunkten) in der Richtung der y-Achse ein Minimum wird.

Die Regressionsgerade ist durch die nachfolgende allgemeine Bestimmungsgleichung charakterisiert:

$$y = a + b x$$

Urica-quant
[mg/100 ml]

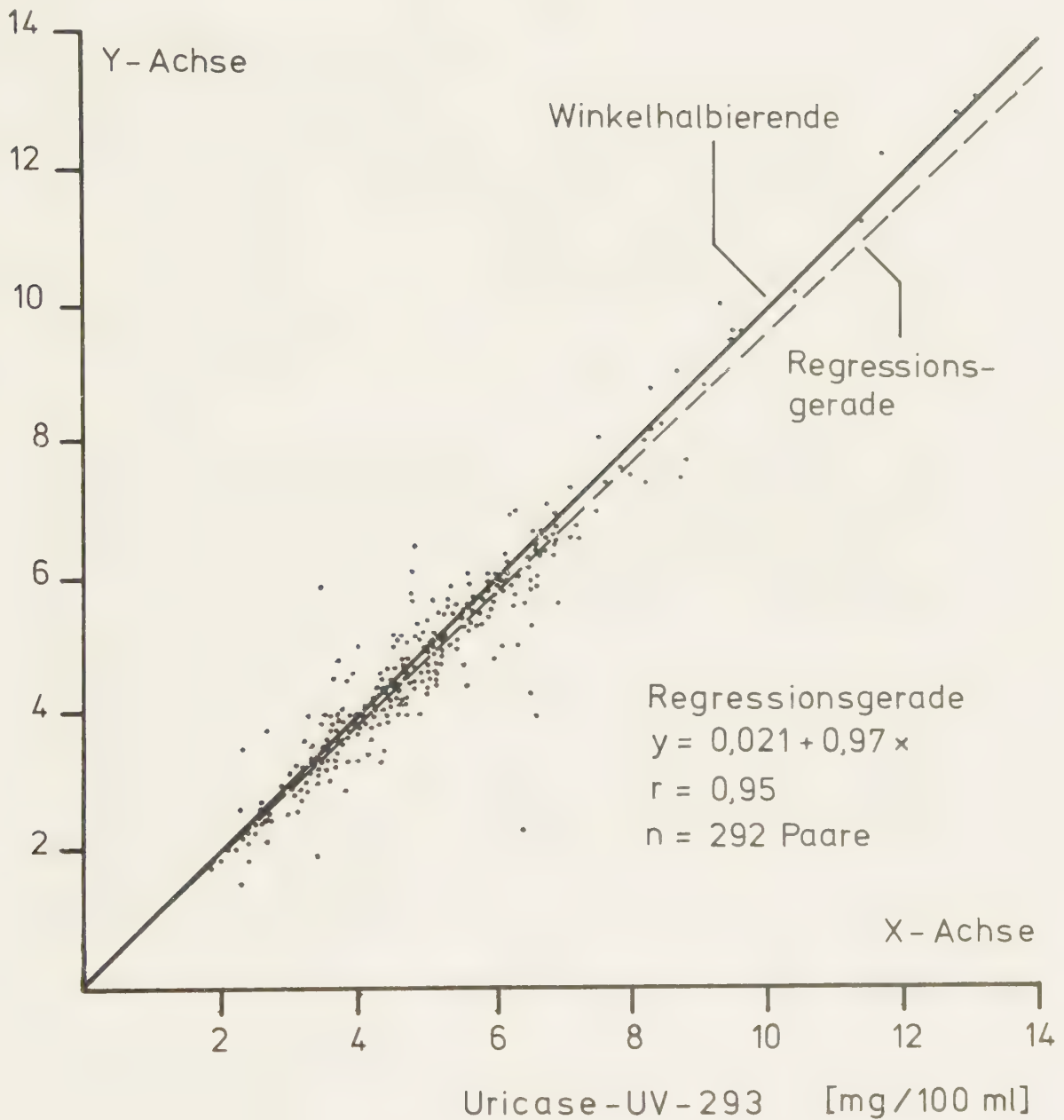


Abb. 2

Methodenvergleich: Urica-quant und Uricase-UV-293-Methode.
Lineare Regressionsanalyse (Nüchternwerte, Zeitpunkt A)

Hierin bedeuten:

- a den Abschnitt der Regressionsgeraden auf der y-Achse für $x = 0$,
- b die Steigung der Regressionsgeraden.

Die Konstanten a und b in dieser Gleichung sind bestimmt durch die Beziehungen:

$$b = \frac{\sum(xy) - \bar{x}\sum(y)}{\sum(x^2) - \bar{x}\sum(x)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Zur Berechnung der Werte benötigt man demnach die folgenden Größen: $\sum(x)$, d.h. die Summe aller x-Werte, $\sum(y)$, d.h. die Summe aller y-Werte, $\sum(x^2)$, d.h. die Summe aller Quadrate von x, und $\sum(xy)$, d.h. die Summe der Produkte aus den x- und y-Werten. $\bar{x}$ und $\bar{y}$ stellen die arithmetischen Mittelwerte dar. Die Steigung b der Regressionsgeraden kann nun mit Hilfe der aufgeführten Werte berechnet werden. Durch Einsetzen von b in die Bestimmungsgleichung von a kann dieses ebenfalls ermittelt werden. Damit ist die Regressionsgerade insgesamt bestimmt und kann nach Berechnung einiger y-Werte für angenommene x-Werte in die Punktwolke eingezeichnet werden.

Der Grad des Zusammenhanges zwischen zwei Variablen x und y, in vorliegendem Fall der Harnsäuregehalte bestimmt nach der Urica-quant- und der Uricase-UV-Methode, läßt sich nun noch mit Hilfe einer einzigen Zahl, nämlich dem Korrelationskoeffizienten r, ausdrücken. Dieser berechnet sich wie folgt:

$$r = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2] [n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Hierin bedeuten:

n = Anzahl der Analysenwerte

x, y = nach der Uricase-UV- bzw. der Urica-quant-Methode analytisch ermittelte Harnsäuregehalte.

Liegt eine positive Korrelation zwischen den x - und y -Werten vor, so strebt r gegen $+ 1,0$. Bei völligem Fehlen einer Korrelation wird $r = 0$. Bei einer negativen Korrelation zwischen x und y nähert sich r dem Wert $- 1,0$. Nach einer Faustregel gilt die Korrelation als eng, wenn der Korrelationskoeffizient einen Wert zwischen $0,7$ und $1,0$ erreicht.

2.4.2.2.2 Überprüfung der Abhängigkeit der Differenzen der Harnsäuregehalte aus Bestimmungen nach Uricase-UV und Urica-quant von der Harnsäurekonzentration im Serum

Die Frage, ob die methodisch bedingten Harnsäureunterschiede von der tatsächlichen Höhe des Harnsäurespiegels abhängen, wurde mit Hilfe einer Regressionsanalyse zwischen den Harnsäurewerten nach Urica-quant und den entsprechenden Differenzen zwischen Uricase-UV und Urica-quant-Ergebnissen untersucht.

Hierzu wurden in einem Histogramm auf Abb. 3 auf der x -Achse die nach Urica-quant bestimmten Harnsäuregehalte im Serum aufgetragen. Auf der y -Achse kamen die entsprechenden Differenzen aus den Bestimmungen nach Uricase-UV und Urica-quant zur Darstellung. Die Regressionsanalyse erbrachte einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,10$.

methodische Differenz
[mg/100 ml]

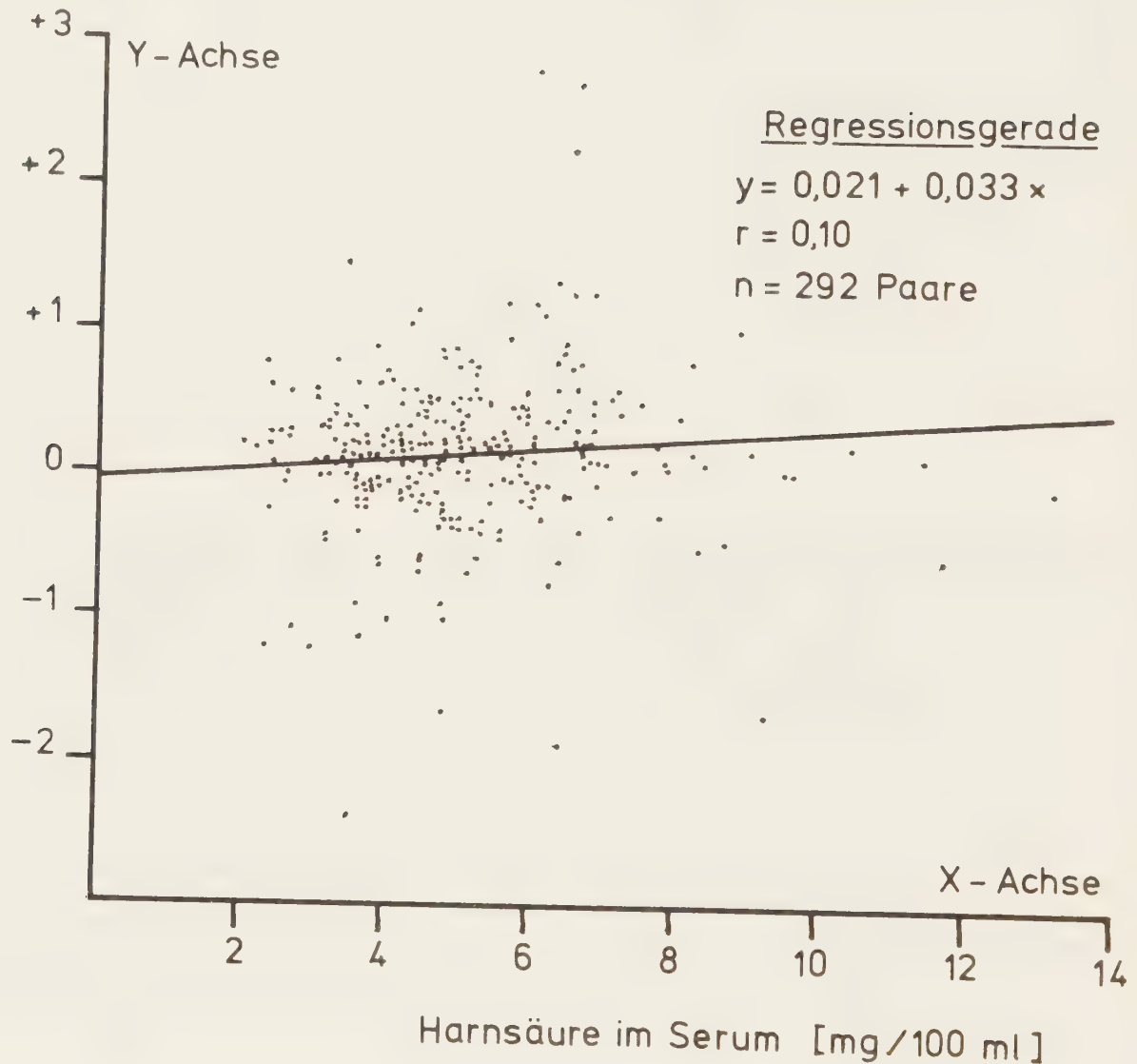


Abb. 3

Überprüfung der Abhängigkeit der methodisch bedingten Differenzen von der Höhe des Harnsäure-Spiegels.

x-Achse: mg Harnsäure/100 ml (Urica-quant).

y-Achse: methodische Differenz zwischen der Uricase-UV-Methode und Urica-quant.

Die Abhängigkeit der methodisch bedingten Harnsäureunterschiede von der tatsächlichen Höhe des Harnsäurespiegels läßt sich auch an Hand des Regressionskoeffizienten beschreiben.

Unter dem Regressionskoeffizienten versteht man das Steigungsmaß b der Regressionsgeraden. Die Berechnung dieses Steigungsmaßes ist bereits oben erläutert. In Abb. 3 wurde ein Regressionskoeffizient von 0,03 ermittelt.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch angeführt, daß die Streuung s der einzelnen Punkte um die Regressionsgerade nach folgender Bestimmungsgleichung berechnet werden kann:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum (y^2) - [a \sum (y) + b \sum (xy)]}{n}}$$

Die Bedeutung und Ermittlung der einzelnen Werte der angeführten Formel sind bereits oben erläutert.

2.4.2.2.3 Überprüfung der aus den Bestimmungen nach Uricase-UV und Urica-quant resultierenden methodischen Differenzen hinsichtlich ihrer statistischen Verteilung

Zur Überprüfung der statistischen Verteilung der methodischen Differenzen der Harnsäuregehalte nach Uricase-UV und Urica-quant eignet sich der sog. Kolmogoroff-Smirnow-Test. Die Erläuterung der schrittweisen, detaillierten Durchführung dieses Testes würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Es sollen deshalb hier nur die Ergebnisse des Kolmogoroff-Smirnow-Testes angeführt werden.

Die Verteilung der 292 Differenzen zwischen den Harnsäurewerten bestimmt nach der Uricase-UV und der Urica-quant-Methode ist nach dem zweiseitigen Kolmogoroff-Smirnow-Test signifikant von der Normalverteilung verschieden.

Die Angaben von Mittelwerten und Standardabweichung als Lage- und Dispersionsparameter ist damit unzulässig, da diese Parameter nur für Normalverteilungen angegeben werden können. Als sinnvolles Maß für die Übereinstimmung beider Methoden wird der 90% - Bereich zwischen dem 5. und 95. Quantil (Q_5 und Q_{95} , s. Abb. 4) der Verteilung der methodischen Differenzen gewählt. Die Grenzwerte für das 5. und 95. Quantil betragen - 0,65 mg Harnsäure/100 ml (Q_5) und + 0,945 mg Harnsäure/100 ml (Q_{95}) (Abb. 4). Der 90 %-Bereich zwischen Q_5 und Q_{95} entspricht in etwa dem sogenannten 2s-Bereich bei Normalverteilung.

Unter dem 2s-Bereich einer Normalverteilung versteht man den 2-fachen Wert der Standard-Abweichung (1s-Bereich). Den 1s-Bereich ergibt das Lot des Wendepunktes der beiden Schenkel der normalverteilten Kurve (= Gauß'sche oder Wahrscheinlichkeitskurve) auf die Abszisse des Histogramms. Das besondere der Normalverteilung liegt darin, daß immer ein ganz bestimmter Prozentsatz von Werten innerhalb der Multiplen von s liegt.

68,3 % aller Werte liegen innerhalb von $\bar{x} \pm 1 s$

95,5 % aller Werte liegen innerhalb von $\bar{x} \pm 2 s$

99,7 % aller Werte liegen innerhalb von $\bar{x} \pm 3 s$

Die Prozentzahlen zeigen, daß der 2s-Bereich mit 95,5 % aller Werte wie oben angeführt etwa dem 90%-Bereich zwischen dem 5. und 95. Quantil entspricht.

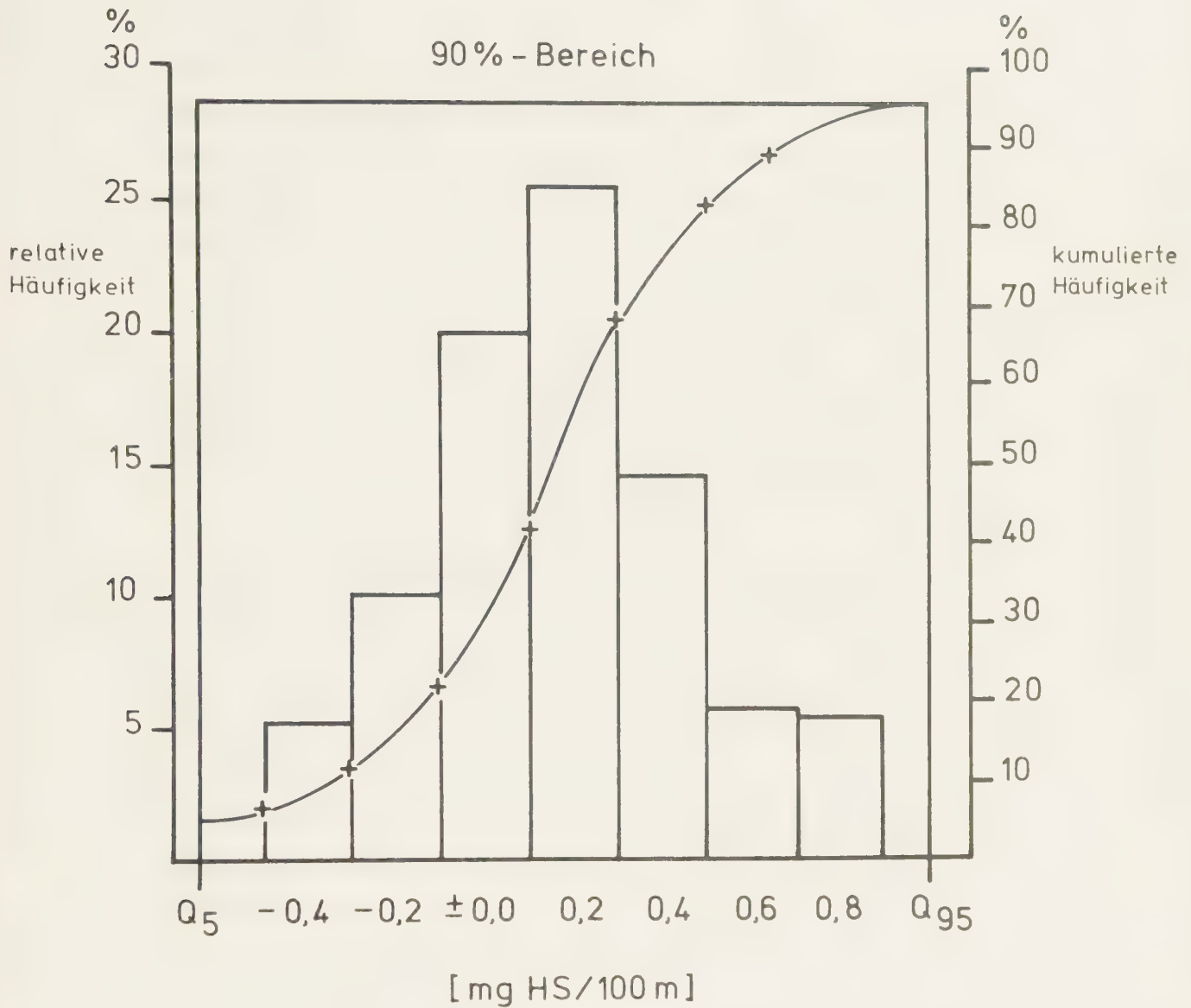


Abb. 4

Häufigkeitsverteilung der methodischen Differenzen zwischen Uricase-UV- und Urica-quant-Methode (Nüchternseren, Zeitpunkt A).

2.4.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Übereinstimmung der nach Uricase-UV und Urica-quant ermittelten Harnsäuregehalte läßt sich an Hand des in Abb. 2 errechneten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,95$ quantitativ charakterisieren. Klinisch-chemische Methoden sollten bei Prüfung der Richtigkeit einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ aufweisen. Vergleicht man den geforderten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ mit dem bei der durchgeführten Regressionsanalyse gefundenen von $r = 0,95$, so kann festgestellt werden, daß zwischen den nach Uricase-UV und nach Urica-quant bestimmten Harnsäuregehalten eine befriedigende Übereinstimmung besteht.

Die mittlere prozentuale Abweichung von der idealen Kurve, die der in Abb. 2 eingezeichneten Winkelhalbierenden zwischen x- und y-Achse mit einer Steigung von 1,0 anstatt 0,97 entsprechen würde, beträgt im diagnostisch relevanten Bereich von 5 bis 9 mg Harnsäure/100 ml Serum 2,6 bis 2,8 %, bzw. maximal 0,15 mg/100 ml für den unteren Teil des diagnostisch relevanten Bereiches und 0,25 mg/100 ml für den oberen Teil des diagnostisch relevanten Bereiches. Die Uricase-UV- und die Urica-quant-Methode zeigen somit auch aus dieser Sicht im diagnostisch relevanten Bereich eine ausreichende Übereinstimmung.

Der in Abb. 3 ermittelte Korrelationskoeffizient $r = 0,10$ besagt, daß zwischen den Harnsäurewerten, wie sie nach der Urica-quant-Methode bestimmt wurden und den entsprechenden Differenzen aus der Uricase-UV-Bestimmung und der Urica-quant-Bestimmung keine Korrelierbarkeit besteht.

Der ebenfalls in Abb. 3 errechnete Regressionskoeffizient von $b = 0,03$ besagt außerdem, daß die Regressionsgerade eine nur äußerst geringe Steigung aufweist, d.h. es besteht nur eine äußerst geringe Abhängigkeit der Größe der methodischen Differenzen von der Konzentration an Harnsäure. Mit höheren Harnsäurewerten werden nur geringfügige Abweichungszunahmen beobachtet. Der durch die Abhängigkeit vom tatsächlichen Harnsäurewert begangene Fehler beträgt nur 1 % der gesamten Streuung und kann daher bei den weiteren Untersuchungen vernachlässigt werden.

Die Ausführungen in Kapitel 3.2.2.3 sprechen dafür, daß der "1s-Bereich" der methodischen Differenzen verläßlich innerhalb der vom "College of American Pathologists" geforderten Standardabweichung von $\leq 0,5$ mg Harnsäure/100 ml im diagnostisch relevanten Entscheidungsbereich von 5 bis 9 mg Harnsäure/100 ml liegen dürfte. Damit ist der Forderung nach medizinischer Brauchbarkeit voll Genüge geleistet (BARNETT 1968).

Aufgrund all der vorausgehenden statistischen Analysen und Schlußfolgerungen an Hand der gewonnenen Ergebnisse kann festgestellt werden, daß mit der Urica-quant-Methode "richtige" Harnsäurewerte gefunden werden.

Der technische Fortschritt gegenüber den auf der chemischen Oxydation der Harnsäure beruhenden Farbstesten ist unverkennbar. Z.B. wird für die verschiedenen Modifikationen der Phosphor-Wolframsäure-Methode nach FOLIN und DENIS (HENRY 1964) ein durchschnittlicher systematischer Fehler von 15 - 20 % in Richtung zu hoher Werte bestätigt.

Bei Einzelwerten fanden wir Abweichungen bis zu 68 %. Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt in der außerordentlich großen Streuung der Differenzen zur Uricase-UV-Methode, die auch unabhängig von der Einnahme von Medikamenten beobachtet wird (RETTENBACHER 1971, STAHLER 1973). Auch ein in Österreich durchgeführter Ringversuch zur Qualitätskontrolle der Harnsäure-Bestimmung demonstrierte nachhaltig die Schwächen der Harnsäure-Analytik hinsichtlich Präzision und Richtigkeit (KAISER et al. 1970). Diese Ergebnisse wurden im Prinzip durch die Untersuchungen von KIM und Mitarbeitern (1971) bestätigt, die verschiedene Harnsäure-Testpackungen miteinander verglichen.

2.4.3 Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka-Applikation i n v i t r o

2.4.3.1 Herstellung der pharmaka-haltigen Seren

43 Medikamente aus verschiedenen Indikationsgebieten wurden einem pharmakafreien Serum-Pool zugesetzt. Der Wirkstoffspiegel entsprach einer üblichen Tageseinzeldosis (TEM), gelöst in 5 Liter Serum. Derartige Wirkstoffspiegel dürften im Patientenserum nur in besonderen Fällen nach parenteraler Applikation erreicht werden.

T a b e l l e 1

Indikation	Präparat -Freiname-	Konzentration pro 5 l Serum	Harnsäure mg/100 ml
Analgetica, Antipyrhetica, Antirheumatica	Acetylsalicylsäure	1,25 g	6,7
	Phenylbutazon		6,2
	Novaminsulfon	1,16 g	6,2
	Hyoscin-N-butylbromid	0,3 g ⁺	6,8
	Misch-Analgeticum	1,3 g ⁺	6,5
	Oxyphenbutazon	1,0 g ⁺	6,5
	Glafenin	1,0 g ⁺	6,2
	Azopropazon	1,0 g ⁺	6,4
	Nifluminsäure	1,0 g ⁺	6,5
Antihyper- uraemica	Indometazin	25 mg	6,4
	Allopurinol	1,25 g ⁺	6,7
	Benzofuranketon	1,0 g ⁺	6,7
	Probenecid	1,4 g ⁺	6,6
Herz und Kreislauf	Digoxin	0,5 mg	6,5
	Carbochromen	1,0 g	6,3
	Corbadrin	1,0 g	6,6
	Glycosidextr. ⁺		
	Äther, Öle	30 Tr.	6,4
Antihyper- tonica	Spironolacton	50 mg	6,4
	a-Methyldopa	0,25 g	6,3
	Thiabutazod	1,3 g	6,2
Antidiabetica	Phenformin	50 mg	6,5
	Glibenecamid	5 mg	6,5
	Tolbutamid	0,5 g	6,8
NNR-Hormon	Prednisolon	40 mg	6,4
Antibiotica Sulfonamid Nitrofurander.	Chloramphenicol	0,25 g	6,3
	Aminobenzylpenicillin	1,5 g	6,5
	Sulfamethoxydiazin	0,25 g	6,4
	Nitrofuradantin	50 mg	6,1
	Sulfanilamidopyrimidin	1,15 g ⁺	6,5

Zu Tabelle 1

Indikation	Präparat -Freiname-	Konzentration pro 5 l Serum	Harnsäure mg/100 ml
Psychopharmaka	Doxepin	5 mg	6,6
	Benzodiazepin	0,15 g ⁺	6,6
Cytostaticum	Cyclophosphamid	0,3 g	6,4
Sedativum	Phenyläthylbarbitur- säure	0,22 g ⁺	6,7
Diureticum	Sulfonylanthranil- säure	0,15 g ⁺	6,6
Laxativum	Bisacodyl	0,1 g ⁺	6,7
Antikoagul.	Cumarinderivat	0,13 g	6,6
Plasmaersatz	Dextran 6 %	100 ml	6,4
	Gelatine 6 %	100 ml	5,9
Kontrastmittel	Trijodbenzoesäure		
	Derivat A	20 ml	6,5
	Derivat B	20 ml	6,5
	Adipinsäuretrijod- anilid	20 ml	6,3
Antimalaria- mittel	Chloroquin	1,0 ml	6,3
Vitamin C	Ascorbinsäure	1,0 g	6,4

Tabelle 1

Beeinflussung von Urica-quant durch Pharmaka in vitro

Wiederfindung der Harnsäure in Seren, denen Pharmaka zu-
gesetzt wurden.

Harnsäure-Sollwert 6,42 mg/100 ml.

+) gesättigte Lösung (16 Std. bei RT geschüttelt)

2.4.3.2 Diskussion der Ergebnisse

Setzt man voraus, daß die der Tabelle 1 zugrunde liegenden Werte normal verteilt sind um den wahren Wert 6,42 mg/100 ml, dann erstreckt sich mit 99 % Sicherheit der 95 %-Bereich (errechnet aus der Präzision von Tag zu Tag aus 40 Messungen) von 5,79 bis 7,05 mg Harnsäure/100 ml. In der beige-fügten Tabelle I liegt kein Wert außerhalb dieses 95 %-Bereiches, d.h., es wurde kein Ausreißer beobachtet, der auf eine Störung der Harnsäure - bestimmung durch ein Pharmacon zurückgeführt werden müßte. 80 % der Werte lagen innerhalb der sehr engen Grenzen des 95 %-Bereiches der Präzision in der Serie aus 40 Messungen, der von 6,21 bis 6,63 mg Harnsäure/100 ml reichte.

Aufgrund der Meßergebnisse (Tabelle I) kann man davon ausgehen, daß Urica-quant durch Pharmaka nicht gestört wird. Insbesondere wurde durch keines der geprüften Antihyperuricaemica eine Störung verursacht, so daß eine Unterbrechung der Therapie aus Gründen der Diagnostik nicht erforderlich ist.

Bei einigen Pharmaka (Probenecid, Oxyphenbutazon, Novaminsulfon, Clofibrat und Ascorbinsäure) wurden lediglich Erhöhungen der Probenleerwerte beobachtet, die die Präzision der Bestimmung beeinträchtigen können. Entsprechende Interferenzen sind jedoch prinzipiell auch bei der Uricase-UV-Methode nach PRAETORIUS und POULSEN gegeben, die als Referenzmethode benützt wird. Drogen und/oder ihre Metabolite können in der Nähe des Absorptionsmaximums der Harnsäure absorbieren.

Dieser Effekt wird durch Mitführen eines Proben-leerwertes kompensiert. Die ebenfalls in Frage kommende direkte Hemmung der Uricase durch Substanzen wie 6-Mercaptopurine und ihre Metabolite sowie durch 6-Thioharnsäure und andere Purin-Analoga (BERGMAN et al. 1956) betrifft in gleicher Weise Urica-quant und die Uricase-UV-Methode. Dieser Effekt wird überwunden durch entsprechende Überdosierung der Uricase. Aufgrund unserer Erfahrungen spielt er für die Praxis keine Rolle, da die Hemmung erst nach therapeutisch nicht angewandten Dosierungen zu Tage kommt.

Beim Vergleich mit entsprechenden Befunden zur chemischen Oxydation der Harnsäure ergibt sich folgendes Bild:

Von verschiedenen Seiten wurde auf teilweise gravierende Verfälschungen der Analysenergebnisse der in der klinisch-chemischen Routine besonders häufig eingesetzten Phosphor-Wolframsäure-Methoden nach FOLIN und DENIS (HENRY 1964) hingewiesen. Literaturzusammenstellungen zu diesem Thema finden sich in den Übersichten von ELKING und KABAT (1968) sowie JOUNG et al. (1972) und KUEFFER (1971). HAUG und Mitarbeiter (1972) kamen im Rahmen einer Untersuchung am Technicon Auto Analyzer SMA 12/60⁺ zu dem Ergebnis, daß zahlreiche Medikamente deutliche bis starke Verfälschungen der Analysenergebnisse bewirken. Auch SING und Mitarbeiter (1972) beobachteten an Hand von quantitativen Studien, daß bestimmte Medikamente und deren Metabolite die chemische Oxydation der Harnsäure stören. Demgegenüber schließen wir aus unseren hier beschriebenen Untersuchungen, daß bei der Urica-quant-Methode mit Störungen durch Pharmaka nicht zu rechnen ist.

2.4.4 Beeinflussung der Urica-quant-Methode durch Pharmaka-Applikation in vivo

2.4.4.1 Ermittlung der Testwerte

An einem Kollektiv von 311 Patienten prüfte der Autor 21 verschiedene Medikamente daraufhin, ob sie die methodische Differenz zwischen Urica-quant und Uricase-UV-Werten beeinflussen. Hierzu wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Paaranalysen mit Urica-quant und Uricase-UV durchgeführt. Zur Erfassung der prinzipiellen methodischen Differenz dienten Nüchternseren; sodann wurden sowohl 1 als auch 8 Stunden nach Einnahme eines Medikamentes die Änderung der Differenzen zwischen den beiden Methoden ermittelt und auf Signifikanz geprüft.

2.4.4.2 Diskussion der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der Nüchternseren wurde, wie oben dargestellt, der 90 %-Bereich des methodischen Fehlers (zwischen dem 5. und 95. Quantil) abgeschätzt. Die Grenzwerte, innerhalb derer 90 % der beobachteten Differenzen lagen, waren $-0,65 \text{ mg/100 ml}$ und $+0,945 \text{ mg/100 ml}$. Unter Vorgabe dieser Grenzwerte wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % unter Zuhilfenahme des exakten Testes nach FISHER geprüft, ob die Sicherheitswahrscheinlichkeit, daß eine genügend große Anzahl der geprüften Differenzen nach Verabfolgung eines Pharmakons noch innerhalb der zulässigen Grenzwerte liegt, ausreicht oder nicht. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, reicht die geforderte Sicherheitswahrscheinlichkeit mit Ausnahme des Medikamentes Oxyphenbutazon, einem Pyrazolonderivat, bei allen geprüften Medikamenten aus.

Tabelle 2

Präparat	N	Zeitpunkt B		Zeitpunkt C	
		n	p	n	p
Acetylsalicyl- säure	15	0	0,377	0	0,377
Allopurinol	20	0	0,235	2	1,00
Ascorbinsäure	13	1	1,00	0	1,00
Azopropazon	10	2	0,261	0	0,607
Benzofuranketon	20	3	0,433	4	0,118
Carbochromen	13	2	0,372	2	0,372
Chloramphenicol	10	1	1,00	1	1,00
Corbadrin	13	0	0,618	2	0,336
Digoxin	10	0	0,607	0	0,607
Glafenin	9	0	1,00	2	0,223
Glycosidextr. et al.	15	1	1,00	0	1,00
Indometazin	25	4	0,299	5	0,160
Misch-Analget.	13	2	0,372	4	1,00
Nifluminsäure	13	2	0,372	3	0,135
Novaminsulfon	15	4	0,058	4	0,058
Oxyphenbutazon	14	4	0,046	4	0,047
Phospholipide + Vit.	10	3	0,072	3	0,072
Prednisolon	10	2	0,261	2	0,261
Probenecid	20	2	1,00	3	0,433
Theophyllin- deriv.	10	1	1,00	0	1,00
Thiabutazid	14	2	0,636	1	1,00

Tabelle 2

Beeinflussung von Urica-quant durch Pharmaka in vivo

2 x 2 Tafeltest nach Fisher unter Zugrundelegung des 90 %-Bereiches ($Q_5 - Q_{95}$) der methodischen Differenzen zwischen Urica-quant und der Uricase-UV-Methode mit den Grenzwerten -0,65 und +0,945 mg Harnsäure/100 ml (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %).

N = Anzahl der beobachteten Differenzen

n = Anzahl der Differenzen, die außerhalb der zulässigen Grenzwerte liegen

p = Sicherheitswahrscheinlichkeit ($p < 0,05$: eine Pharmaka-Störung muß angenommen werden).

Beim Oxyphenbutazon wurde die geforderte Sicherheitswahrscheinlichkeit nur geringfügig unterschritten. Wie oben bereits angedeutet, sahen wir gleichzeitig eine Zunahme der Probenleerwerte, die sich negativ auf die Präzision der Analytik auswirkt.

Da die Möglichkeit für störende Wirkungen von Pharmaka im *in vivo*-System unvergleichlich größer sind, als im *in vitro*-Ansatz, konnte es in dieser Untersuchung nur darum gehen, orientierend zu prüfen, ob und wieweit die Übereinstimmung der geprüften enzymatischen Harnsäure-Bestimmungsverfahren durch Applikation von Medikamenten gestört werden kann. Beobachtungen, wie die von BLUESTONE et al. (1969), daß Medikamente wie Acetylsalicylsäure, Phenylbutazon und Probenecid im Unterschied zu den anderen Medikamenten auch die Urat-Bindung an Plasmaproteine beeinflussen können, wurden hier nicht weiter verfolgt.

Eine quantitative Abschätzung des Ausmaßes der durch Pharmaka bei Patienten zu erwartenden Störungen der Analytik ließ erkennen, daß abgesehen von einer Ausnahme die Differenzen kleiner sind, als die auch aus methodischen Gründen zu erwartenden Abweichungen zwischen den Bestimmungsmethoden. Da die Uricase-UV-Methode wegen ihrer hohen Spezifität als Referenzmethode angesehen wird, läßt sich aus den Ergebnissen folgern, daß Urica-quant auch in pharmakahaltigen Seren mit großer Sicherheit richtige Analysenergebnisse bringt. Diese Aussage wird gestützt durch den Befund, daß die Übereinstimmung der Analysenergebnisse auch in Seren von schwer nierengeschädigten Patienten hervorragend ist (STAEHLER 1973). Gerade diese Seren bereiten sonst in der Analytik die allergrößten Schwierigkeiten.

3. Z U S A M M E N F A S S U N G

Durch die gravierende Zunahme der Gicht in den letzten Jahrzehnten ist es erforderlich geworden, an die Genauigkeit der Harnsäurebestimmung im Serum einen strengen Maßstab anzulegen, da die exakte Bestimmung die Basis für eine optimale Therapie darstellt.

In der vorliegenden Arbeit werden nach einem geschichtlichen Abriß zur Harnsäurebestimmung die heute gängigen Methoden der Harnsäurebestimmung erläutert.

Aus der Diskussion der Probleme der Harnsäurebestimmung ergibt sich das Thema der vorliegenden Arbeit:

"Inwieweit wird die Harnsäurebestimmung mit Hilfe der neuentwickelten Urica-quant-Methode durch Pharmaka beeinflusst?"

Umfangreiche amerikanische Untersuchungen über den Einfluß von Pharmaka auf die Ergebnisse von Laboruntersuchungen haben gezeigt, wie vielfältig und komplex die Störmechanismen sind, die zu falschen Analysenwerten führen können.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bestimmung der Harnsäure nach der Urica-quant-Methode durchgeführt. Zur Überprüfung der Urica-quant-Methode diente als Referenzmethode die Uricase-UV-Methode.

Beide Methoden wurden mit Hilfe der Arbeitsanweisungen der Firma Boehringer, Mannheim, im Detail erläutert.

Die Testergebnisse, die an Hand der Urica-quant-Methode in vitro und in vivo gewonnen wurden, wurden mit Hilfe statistischer Prüfverfahren analysiert und diskutiert.

Bevor die Beeinflußbarkeit der Urica-quant-Methode durch Pharmaka untersucht wurde, war die Überprüfung der Methode selbst auf ihre Eignung erforderlich. Bei einer Anzahl von 40 Analysen ergab sich für die Präzision in der Serie ein arithmetisches Mittel von 4,69 mg/100 ml Serum sowie ein Variationskoeffizient von 1,7 %. Für die Präzision von Tag zu Tag wurden ein arithmetisches Mittel von 5,0 mg/100 ml Serum sowie ein Variationskoeffizient von 4,8 % errechnet. Harnsäurebestimmungen mit Hilfe der Urica-quant-Methode an Seren unterschiedlicher Konzentration ergaben, daß die Präzision dieser Methode durch die Harnsäurekonzentration kaum beeinflußt wird.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte schließlich nachgewiesen werden, daß die Reaktion nach der Urica-quant-Methode bis mindestens 20 mg Harnsäure/100 ml Serum linear ist.

Die Übereinstimmung der Analysenergebnisse in pharmaka-freien Seren nach der Urica-quant-Methode und der Uricase-UV-Methode als Referenzmethode wurde an Hand einer linearen Regressionsanalyse überprüft. Ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,95$ spricht für eine befriedigende Übereinstimmung der beiden Methoden. Der äußerst geringe Einfluß der Harnsäurekonzentration auf die methodischen Differenzen nach der Uricase-UV- und der Urica-quant-Methode drückt sich in einem Regressionskoeffizienten von $b = 0,03$ aus. Aufgrund dieser beiden statistischen Ergebnisse kann festgestellt werden, daß mit der Urica-quant-Methode "richtige" Harnsäurewerte gefunden werden.

In der Literatur wird auf teilweise gravierende Verfälschungen der Analysenergebnisse durch Pharmaka hingewiesen.

Die Untersuchungen mit Hilfe der Urica-quant-Methode in vitro zeigen, daß bei Anwendung dieser Methode mit Störungen durch Pharmaka nicht zu rechnen ist.

Auch die Untersuchungen in vivo ergaben, daß die Urica-quant-Methode selbst in pharmakahaltigen Seren mit großer Sicherheit "richtige" Analysenergebnisse bringt.

Davon unberührt bleiben natürlich tatsächliche Beeinflussungen des Harnsäurespiegels durch bestimmte Pharmaka, die jedoch hier nicht zur Diskussion stehen. Bei Niereninsuffizienzen verschiedener Genese kann es neben Erhöhung des Harnsäurespiegels auch zu einer Akkumulation von möglicherweise interferierenden Medikamenten und deren Metaboliten kommen, die ihrerseits die Ergebnisse der Harnsäurebestimmungen beeinflussen. Solche Fehlermöglichkeiten sind jedoch nach unseren Ergebnissen bei der Bestimmung mit der Urica-quant-Methode nicht zu erwarten.

4. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Barnett, R.N.:
Medical Significance of Laboratory Results.
Am.J.Clin.Path. 50, 671 (1968)
2. Baum, H., Huebscher, G. and Mahler, H.R.:
Studies on Uricase II. The Enzyme - Substrat Complex.
Biochem. Biophys. Acta 22, 514 (1956)
3. Benedikt, S.R. and E.H. Hitchcock:
J. Biol. Chem. 20, 619 (1915)
Zitiert in : Richterich R.: ³⁴⁾
4. Bergmann, F., Kwietny-Gourin, H., Ungar-Waron, H., Kalmus, A. and Tamari, M.:
Reaction of structure to the inhibitory activity purins against urateoxydase.
Biochem. J. 86, 567 (1963)
5. Bernt, E. und H.U. Bergmeyer :
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, 1885 (1970)
6. Bien, E.J. and W. Troll:
Proc. Coz. Exp. Biol. med. 73, 370 (1950)
Zitiert in : Richterich R.: ³⁴⁾
7. Block, W.D. and N.C. Gelb:
J. Biol. Chem. 168, 747 (1947)
Zitiert in : Richterich R.: ³⁴⁾
8. Bluestone, R.I., Kippen, J.R., Klingenberg:
Effect of drugs on urate-binding to Plasmaproteins.
Bit. med. J. 1969 , IV , 590
9. Bulger, H.A. and H.E. Johns:
J. Biol. Chem. 140, 427 (1941)
Zitiert in : Rettenbach, F.: ³³⁾

10. Bünnemann, Chr. und J.D. Kruse-Jarres:
Vergleichende Untersuchungen reduktometrischer
und enzymatischer Harnsäurebestimmungen.
(Klin.chem.Labor der chir.Univ.Klinik Freiburg/Brsg.)
11. Campbell, R.C.:
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Georg Thieme-Verlag-Stuttgart (1971)
12. Draeger, M.:
Mathematik für Naturwissenschaftler
Dr.Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt (1972)
13. Carroll, J., J.H. Coburn, R. Douglas and H.C. Babson:
Clin.Chem. 17 , 158 (1971)
Zitiert in : Bünnemann Chr. und J.D. Kruse-Jarres¹⁰⁾
14. Caraway, W.T.:
Standart Methods in Clinikal Chemistry 4, 239 (1963)
15. Elking, S.M. and H.F. Kabat:
Drug induced modifications of laboratory test values.
Am.Soc.of.Hosp.Pharm. 25 , 485 (1968)
16. Eulenburg, A.:
Harnsäure: Realenzyklopaedie der gesamten Heilkunde.
636 (1894)
17. Folin, O. and W. Denis :
J.Biol.Chem. 13, 469 (1912/1913)
Zitiert in : Rettenbacher, F.:³³⁾
18. Gruber, W.:
Enzymatic Determination of Uric Acid
Methodenvergleich zur Harnsäurebestimmung
-Harnsäurevortrag in Kopenhagen - (1972)
19. Hansen, Ph.D. and Owyang:
Effects of Drugs on Clinical Laboratory Results.
American Journal of Hospital Pharmacy Vol.25 (1968)

20. Haug, H.G. Dorloechter und G. Hermann:
Der Einfluß von Pharmaca auf Auto-Analyzer-Tests.
Diagnostik 5 , 85 (1972)

21. Henry, R.J.:
Clinical Chemistry: Prinzipels and Techniques.
Harper and Row, Publishers , USA, (1964)

22. Kageyama, N.:
A direct colorimetric determination of uric acid
in serum and urin with Uricase - Catalase-System.
Clin.Chem.Acta 31 , 421 (1971)

23. Kalckar, H.M.
Differential spectrophotometry of purine compounds
by means of specific enzymes.
I. Determination of hydroxypurine compounds.
J.Biol.Chem. 167 , 429 (1947)

24. Kim, E.K., L.D. Waddel, M.L.E. Sunderland and J.E. Logan:
Observations on diagnostic kits for the detemination
of Uric Acid.
Clin.Biochem., 4 , 279 (1971)

25. Kaiser E., V. Schreiber, P. Bauer, L. Havelee, F.X. Wohlzogen,
F. Gabl:
Qualitätskontrolle der Harnsäurebestimmung, Bericht
über den österreichischen Seronorm-Rundversuch 1970.
Wiener klin. Wschr. 84 , 217 (1972)

26. Kortuem und O. Kling:
Fehlerquellen bei der Harnsäurebestimmung im Serum
mit Uricase und Absorptionsmessungen im Ultraviolett.
Ärzt..Labor 18 , 33 (1972)

27. Kreyszig, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Verlag: Van den Heuck & Ruprecht-Göttingen (1973)

28. Kueffer, H.:
Ursachen irreführender Laborresultate: Störungen
durch Medikamente.
Therap.Umschau 28, 669 (1971)

29. Mertz, D.P.:
Vergleichende Untersuchungen der enzymatischen
Bestimmung von Harnsäure mit einer einfachen
kolometrischen Methode.
Clin.Wochenschrift 51, 96 (1973)

30. Mertz, D.P.:
Gicht: Grundlagen und Therapie.
Thieme 1971

31. Offer, T.R.:
Cent.Bl.Physiol.: 8, 801 (1894)
Zitiert in : Richterich R.: ³⁴⁾

32. Praetorius, E., und H. Poulsen:
Enzymatic determination of Uric Acid by ultraviolet
spectrophotometry.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 3, 273 (1953)

33. Rettenbacher, F.:
Zur Methodik der Harnsäurebestimmung
Vergleich von Farbtest und enzymatischer Bestimmung.
Wiener klin.Wochenschrift , 214 (1972)

34. Richterich, R.:
Harnsäure: UV-Spektrophotometrie mit Uricase.
Klinische Chemie (Theorie und Praxis)
Verlag: S.Karger , 332 (1971)

35. Richterich, R.:
Einführung in die Statistik.
Klinische Chemie (Theorie und Praxis)
Verlag: S.Karger , 34 (1971)

36. Sing, H.P., M.A. Hebert and M.H. Gault:
Effect of some drugs on clinical laboratory
values as determined by the Technicon SMA 12/60
Clin.Chem. 18, 137 (1972)

37. Staehler, F.:
Publikation in Vorbereitung.

38. Wolfson, W.Q., B. Huddleston and R. Levine:
J.Clin.Invest. 26 , 995 (1947)
Zitiert in : Richterich R.³⁴⁾

39. Young, D.S., D.W. Thoma, R.B. Friedmann und
L.C. Prestauer:
Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests
Clin.Chem. 18 , 1041 (1972)

Herrn Prof.Dr.med.H. M a t h i e s
danke ich für die Überlassung des Themas,
für die Möglichkeit, in seiner Klinik die
Untersuchungen durchgeführt haben zu kön-
nen und die Beratung bei der Durchführung
der Arbeit.

Herrn Priv.Doz.med.F. S t a e h l e r
vom Forschungszentrum der Firma Boehringer/
Mannheim in Tutzing und seinen Mitarbeitern
danke ich für die Unterstützung bei der sta-
tistischen Auswertung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 30. Juli 1940 wurde ich als erstes Kind des Volksschulrektors Karl Wittner und seiner Ehefrau Irmtraut, geb. Esslinger in Budweis geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Edelmühle/Ndby. und des Humanistischen Gymnasiums in Passau und Fürstenzell bestand ich 1962 am Humanistischen Gymnasium Fürstenzell die Reifeprüfung. Im November 1962 nahm ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen auf. Im Frühjahr 1964 legte ich die naturwissenschaftliche und im Sommer 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. Ich studierte nach dem Physikum einige Semester an der Universität Hamburg. Im Oktober 1969 schloß ich mein Studium an der Universität Erlangen mit der ärztlichen Prüfung ab. Nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit erhielt ich im Sommer 1971 die ärztliche Approbation. Die Dissertationsarbeit begann ich im Jahre 1972 an der I. Medizinischen Klinik des Rheumazentrums Bad Abbach. Im gleichen Jahr begann ich meine Ausbildung zum Facharzt für Anaesthesie. Ich befinde mich zur Zeit der Drucklegung dieser Arbeit im letzten Jahr die Fachausbildung zum Anaesthesisten.

